



- (51) 국제특허분류:
C12M 3/00 (2006.01) C12M 3/06 (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/013732
- (22) 국제출원일: 2016년 11월 25일 (25.11.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0166102 2015년 11월 26일 (26.11.2015) KR
10-2016-0158138 2016년 11월 25일 (25.11.2016) KR
- (71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 46241 부산시 금정구 부산대학로 63번길 2 (장전동, 부산대학교), Busan (KR).
- (72) 발명자: 고정상 (GO, Jeung Sang); 46232 부산시 금정구 금강로 503, 607동 2102호, Busan (KR). 전형진 (JEON, Hyeong Jin); 47592 부산시 연제구 월드컵대로 10번길 10, Busan (KR). 김문정 (KIM, Moon Jeong); 46311 부산시 금정구 부곡로 25-3, 205호, Busan (KR). 박동혁 (PARK, Dong Hyeok); 50580 경상남도 양산시

상북면 감결길 17, 101동 805호, Gyeongsangnam-do (KR).

- (74) 대리인: 남건필 (NAM, Gunpil) 등; 07299 서울시 영등포구 경인로 775, 에이스하이테크시티 2동 508호(문래동 3가), Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

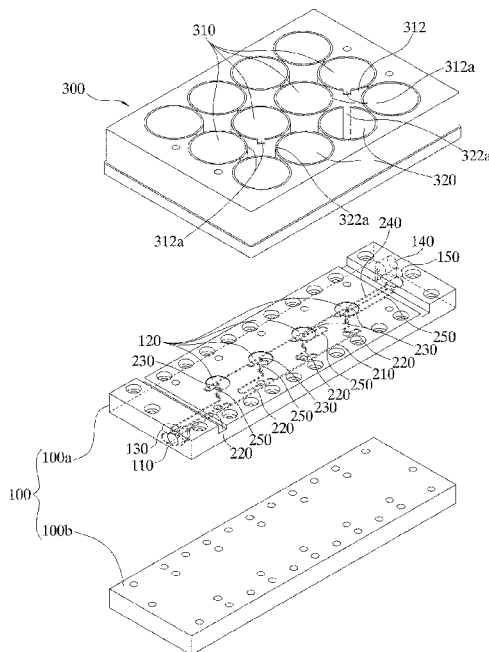
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MICROFLUIDIC PERFUSION CELL CULTURE SYSTEM

(54) 발명의 명칭 : 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템

[5:1]



(57) Abstract: A microfluidic perfusion cell culture system is disclosed. The microfluidic perfusion cell culture system comprises: a substrate; a microfluidic injection channel formed within the substrate to guide a fluid along a plane direction of the substrate; two or more microfluidic branch channels branched from the microfluidic injection channel within the substrate; microfluidic outlet channels extending in the direction of the upper surface of the substrate from the end of each of the branch channels and penetrating the upper surface of the substrate so as to form through-holes; and well plates arranged on the upper surface of the substrate and fluid-communicatively connected with each of the outlet channels. Such a microfluidic perfusion cell culture system uses a microfluidic system. The microfluidic system refers to a technology for controlling a flow of a trace of liquid or gas (in the order of nanoliters or picoliters) within a microminaturized device, and shows unique characteristics such as a streamline flow, large surface area characteristics, and a surface tension greater than inertia, unlike a macro system. The present invention can control and evaluate a perfusion cell culture system by precisely distributing the right nutrients to a cell culture system through the microfluidic system.

(57) 요약서: 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템

[다음 쪽 계속]



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

개시된다. 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템은, 기관; 상기 기관 내에 상기 기관의 평면 방향에 따라 유체를 가이드하도록 구성된 마이크로 유체 주입채널; 상기 기관 내에 상기 마이크로 유체 주입 채널에 분지된 둘 이상의 마이크로 유체 분지채널들; 상기 각 분지채널의 종단부에서 상기 기관의 상면으로 방향으로 연장되어 상기 기관의 상면을 관통하여 관통개구를 형성하는 마이크로 유체 출구채널들; 및 상기 기관의 상면에 위치하고 상기 각 출구채널과 유체 소통가능하도록 연결된 웰플레이트들을 포함한다. 이러한 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템은 마이크로 유체 시스템을 이용한다. 마이크로 유체 시스템은 극소량(나노리터 또는 피코리터 정도)의 액체나 기체를 극히 소형화시킨 장치 내에서 그 흐름을 제어하는 기술을 의미하는 것으로 매크로 시스템과는 달린 유선형 흐름, 큰 표면적 특성 및 관성보다 큰 표면장력 등의 특이한 특성을 보여준다. 본 발명은 이러한 마이크로 유체 시스템을 통해 정확한 영양분을 세포 배양 시스템에 정밀 분배하여 관류 세포 배양 시스템의 제어 및 평가를 가능하게 한다.

명세서

발명의 명칭: 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 배양을 위한 시스템에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 3D 세포 배양이 가능하도록 마이크로 유체 시스템을 이용한 관류 세포 배양 시스템에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 종래의 세포배양기술로 배양한 세포는 세포가 2차원 방향으로 퍼진 단층세포이기 때문에, 생체 내와 동등한 3차원 조직을 구축할 수 없고, 세포가 체내에서 갖고 있는 특이적인 기능을 장시간 유지할 수 없으며, 이에 따라 시뮬레이션의 정밀도가 보장되지 않는 문제가 있다.
- [3] 한편, 기존의 세포배양(cell culture) 실험은 일반적인 플레이트(plate) 위에서 주기적으로 배양액을 갈아주면서 세포를 성장시키고 관찰하는 생체 내와는 다른 환경의 실험이라고 할 수 있다. 그에 비해 마이크로 유체 시스템(micro fluidic system)은 마이크로 단위의 아주 작은 영역에서 배양액의 흐름을 통해 세포를 성장시킨다. 마이크로 유체 시스템은 시스템 내에 포함되어 있는 마이크로 유체 채널들의 매우 작은 사이즈로 인해 생체와 비슷한 물리적 환경을 제공하고 충분한 산소를 공급하는 동시에 빠른 영양분의 확산을 도와준다. 그러한 조건은 세포관련 실험에 있어 일반적인 매크로 스케일의 실험보다 세포에 적합한 환경을 제공함으로써 보다 정확한 실험 결과를 얻을 수 있다. 이를 위한 셀 칩과 관련한 많은 연구들이 이루어지고 있으나 현재까지는 마이크로 유체 채널 (micro fluidic channel) 표면 위의 코팅을 통한 2D 상의 시스템의 세포실험이 많이 이루어지고 있다.
- [4] 그러나 이러한 2D 실험은 제대로 된 결과를 얻을 수 없다. 생체는 기본적으로 3D상의 환경이기 때문이다. 세포는 주위 환경의 아주 미세한 변화에도 민감하게 반응하여 전혀 다른 실험 결과를 보일 수 있다. 그리하여 최근 3D 환경에서 세포를 배양하기 위한 연구들이 진행되고 있다.
- [5] 따라서, 3차원 세포배양기술에 미세유체기술, 즉 마이크로 유체 시스템이 통합될 경우, 혈관신생, 면역반응, 암의 전이 등 인체 내 다양한 현상에서 관찰되는 세포의 이동, 세포간의 상호작용, 세포와 세포외기질(Extracellular matrix)과의 상호 작용을 고해상도 실시간으로 바로 관찰하고 분석할 수 있으며, 다양한 물리적, 화학적 자극을 가할 수 있어, 특정한 요소, 환경 등이 혹은 그 조합이 세포에 어떠한 방식으로 영향을 미치는지 체계적인 연구가 가능한 장점이 있다.
- [6] [선행기술문헌]
- [7] [특허문헌]

[8] (특허문헌 1) 대한민국 등록특허 10-1412155

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 정확한 농도 분배 및 평가가 가능하고 미세환경이 정밀하게 모사된 관류 세포 배양 시스템을 제공함에 있다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명은 마이크로 유체 채널 시스템을 이용한 관류 세포 배양 시스템에 관한 것이다.

[11] 본 발명은 마이크로 유체 시스템을 이용한다. 마이크로 유체 시스템은 극소량(나노리터 또는 피코리터 정도)의 액체나 기체를 극히 소형화시킨 장치 내에서 그 흐름을 제어하는 기술을 의미하는 것으로 매크로 시스템과는 달린 유선형 흐름 특성, 큰 표면적 특성 및 관성보다 큰 표면장력 특성 등의 특이한 특성을 보여준다. 본 발명은 이러한 마이크로 유체 시스템을 통해 정확한 영양분을 세포 배양 시스템에 정밀 분배하여 관류 세포 배양 시스템의 제어 및 평가를 가능하게 한다.

[12] 본 발명의 관류 세포 배양 시스템은, 기관; 상기 기관 내에 상기 기관의 평면 방향에 따라 유체를 가이드하도록 구성된 마이크로 유체 주입채널; 상기 기관 내에 상기 마이크로 유체 주입 채널에 분지된 둘 이상의 마이크로 유체 분지채널들; 상기 각 분지채널의 중단부에서 상기 기관의 상면으로 방향으로 연장되어 상기 기관의 상면을 관통하여 관통개구를 형성하는 마이크로 유체 출구채널들; 및 상기 기관의 상면에 위치하고 상기 각 출구채널과 유체 소통가능하도록 연결된 웰플레이트들을 포함하는, 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 제공한다.

[13] 상기 마이크로유체채널들을 통해 세포 배양에 필요한 영양분 및/또는 산소가 웰플레이트로 공급되고 상기 웰플레이트에서는 세포가 배양된다. 웰플레이트 상단에 상단의 배출수단을 통해 웰플레이트의 배양물을 배출된다. 이처럼 마이크로채널들로 계속 공급되고 배출수단을 통해 계속 배출되는 관류 시스템을 제공한다.

[14] 상기 분지채널들은 서로 길이가 상이하여 푸아죄유(poiseuille) 법칙에 따라 각 분지 채널간의 유량이 상이하도록 구성된다. 푸아죄유 법칙은 아래 수학적식1과 같다.

[15] [수학적식 1]

$$[16] \quad R = \frac{\Delta P}{Q} \Rightarrow L = \frac{\pi d^4 R}{128 \mu}$$

[17] 여기서, R: 저항, P: 압력강하, Q: 유량, d: 채널의 직경, μ : 점성계수, L: 채널의 길이이다.

[18] 푸아죄유 법칙에 따라, 마이크로 채널의 길이 별로 상이한 유량이 공급된다. 즉,

본 발명의 주입채널을 통해 흐르는 유체는 이의 분지채널들로 나뉘어 유입되는데 분지채널의 길이에 따라 나뉘어 유입되는 유량이 차이가 난다.

- [19] 상기 분지채널로의 유량이 상기 주입채널의 유체의 흐름 방향에 따른 순서에 대해 선형 증가 또는 선형 감소하도록, 상기 각각의 분지채널의 길이가 구성되어 있음을 특징으로 한다. 분지 채널별 유량의 차이가 선형 증가 또는 감소토록 설정함을 일 특징으로 하며, 이는 각 웰플레이트의 공급 영양분의 비교 평가를 용이하게 한다.
- [20] 본 발명의 상기 기관은 상기 주입채널로 마이크로유체를 주입하는 유입채널을 포함하고, 상기 유입채널과 상기 주입채널 사이에 버블트랩을 포함함을 특징으로 한다. 버블트랩은 예를 들어 마이크로채널의 측면에 형성된 매크로 크기의 공간으로서 채널보다 높게 형성된 공간이다. 마이크로 채널을 통해 흐르는 유체 내에 기체(버블)이 포함되어 있으면 그 버블 기체는 이 공간을 만나게 되어 버블을 그 공간 내로 상승해 빠져나가고 유체는 계속 마이크로 채널 내로 이동하게 된다.
- [21] 상기 기관 상면은 다수의 캐비티(cavity)를 가지며, 상기 출구채널들에 의한 관통개구들은 상기 캐비티의 내면에 형성되어 있고, 상기 웰플레이트 하면은 둘 이상의 구멍을 가지고, 상기 캐비티의 최장 너비는 상기 웰플레이트 하면의 최단 너비보다 작아 상기 웰플레이트가 상기 캐비티 위에 위치하면서 웰플레이트 하면과 캐비티 내면이 이루는 공간을 형성하며, 상기 캐비티 공간에 상기 관통개구로부터 유출된 유체가 저장되고 이 캐비티의 유체가 상기 웰플레이트 하면의 하나 이상의 개구를 통해 상기 웰플레이트로 유입됨을 특징으로 한다.
- [22] 상기 웰플레이트는 이의 측벽 상단에 개구를 포함하고, 상기 개구를 통해 웰플레이트의 웰플레이트 배양물이 배출되도록 구성된다.
- [23] 상기 기관은 상기 웰플레이트 열의 상기 주입채널의 위치하지 않은 다른 측에 제2 마이크로 유체 주입채널 및 상기 제2 마이크로 유체 주입 채널에 분지된 둘 이상의 제2 마이크로 유체 분지채널들을 추가로 포함하며, 상기 제2 분지채널의 종단부는 상기 분지채널의 종단부와 합류되어, 상기 마이크로유체 출구채널에 유체소통가능하게 연결되어 있음을 특징으로 한다.
- [24] 상기 제2 분지채널들은 서로 길이가 상이하여 푸아죄유(poiseuille) 법칙에 따라 각 제2 분지 채널간의 유량이 상이하도록 구성된다.
- [25] 상기 제2 분지채널로의 유량이 상기 주입채널의 유체의 흐름 방향에 따른 순서에 대해 선형 증가 또는 선형 감소하도록, 상기 각각의 제 2 분지채널의 길이가 구성되어 있음을 특징으로 한다.
- [26] 상기 기관은 상기 주입채널로 마이크로유체를 주입하는 유입채널을 포함하고, 상기 유입채널과 상기 주입채널 사이에 버블트랩을 포함한다.
- [27] 상기 분지채널 종단부 및 상기 제2 분지채널의 종단부의 합류지점부터 상기 마이크로유체 출구채널까지 혼합 채널을 추가로 더 포함함을 특징으로 한다. 바람직하게는 상기 혼합 채널은 곡류(Meander) 구간을 포함하여 혼합의 효율을

향상시킴을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [28] 본 발명의 관류 세포 배양 시스템은, 정확한 농도 분배에 따른 영양 성분의 제공이 제어 가능하고 이를 비교 관찰할 수 있도록 구성되어 다양한 영양 성분 및 산소 농도 입력에 대한 중앙 증식을 관찰하고 정량적으로 평가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 본 발명의 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템의 구성을 나타낸 분해 사시도이다.
- [30] 도 2는 도 1에 도시된 기관의 상판의 평면도이다.
- [31] 도 3은 도 1에 도시된 기관의 상판의 저면 사시도이다.
- [32] 도 4는 도 1에 도시된 세포 배양 키트의 평면도이다.
- [33] 도 5는 도 1에 도시된 세포 배양 키트의 저면 사시도이다.
- [34] 도 6은 도 1에 도시된 기관 상에 세포 배양 키트가 결합된 상태를 나타낸 단면도이다.
- [35] 도 7은 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 통해 유체가 서로 다른 유량으로 정확히 공급되는지 여부의 테스트 결과를 나타낸다.
- [36] 도 8a는 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 통해 유체를 주입한 경우 정확한 농도 분배로 공급되는지 여부의 테스트 결과를 나타낸다.
- [37] 도 8b는 도 8a의 테스트에 따른 각각의 웰플레이트 내의 유체를 정량적 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [38] 도 9a는 웰플레이트들에 배양액과 약물이 서로 다른 정확한 농도 분배로 주입된 상태를 나타낸다.
- [39] 도 9b는 PI staining을 통해 도 9a에 도시된 각 웰플레이트 내의 배양물에서 추출된 DNA의 양을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [40] 도 9c는 각 웰플레이트 내로 공급된 약물의 농도에 따라 세포가 함유하고 있던 단백질 정량분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [41] 도 10은 본 발명의 혼합 채널을 예시한 도면이다.
- [42] 도 11은 본 발명의 혼합 채널의 굵기 특성에 따른 혼합 효율을 보여주는 도면이다.
- [43] 도 12는 실시예2에서 사용한 유체를 정량적으로 주입하기 위한 시린지 펌프(Harvard PHD 2000)를 통해 본 발명의 시스템에 주입하고 있는 모습을 보여주는 사진이다.
- [44] 도 13은 실시예2의 형광 분석의 결과를 보여주는 사진이다.
- [45] 도 14는 실시예2의 검량선 제작을 위해 제조한 스탠다드 샘플의 사진이다.
- [46] 도 15는 실시예2의 스탠다드 샘플을 통한 형광 분석의 광도 데이터를 그래프로 나타내어 2차 곡선의 검량선이 근사값 $R^2 = 0.9977$ 를 보여주는 그래프이다.
- [47] 도 16에서 도 16(a)는 실시예2의 형광 분석 결과이고, 도 16(b)는 검량선에

피팅하여 농도 비율로 나타낸 결과이다.

[48] 도 17은 버블트랩이 적용되지 않은 시스템에서 수행한 결과이다.

[49] 도 18은 버블트랩이 적용된 본 발명의 시스템의 경우, 시린지의 교체 이후 주입 유체와 함께 주입되는 기포가 버블트랩에 포집 되는 것을 보여주는 사진이다.

[50] 도 19 및 20은 혼합 채널을 함유하는 본 실시예2에서 사용된 본 발명의 시스템이다.

발명의 실시를 위한 형태

[51] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템에 대해 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호를 유사한 구성요소에 대해 사용하였다. 첨부된 도면에 있어서, 구조물들의 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하여 도시한 것이다.

[52] 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제1 구성요소는 제2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성요소도 제1 구성요소로 명명될 수 있다.

[53] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[54] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[55] 도 1은 본 발명의 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템의 구성을 나타낸 도면이고, 도 2는 도 1에 도시된 기관의 상판의 평면도이고, 도 3은 도 1에 도시된 기관의 상판의 저면 사시도이고, 도 4는 도 1에 도시된 세포 배양 키트의

평면도이고, 도 5는 도 1에 도시된 세포 배양 키트의 저면 사시도이다.

- [56] 도 1 내지 도 5를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템은, 기관(100), 마이크로 유체 주입채널(210), 마이크로 유체 분지채널들(220), 마이크로 유체 출구채널들(230) 및 웰플레이트들(310)을 포함한다.
- [57] 기관(100)은 유체, 즉 세포 배양에 필요한 영양분을 웰플레이트들(310)로 공급하기 위해 상기 마이크로 유체 주입채널(210), 마이크로 유체 분지채널들(220) 및 마이크로 유체 출구채널들(230)이 형성되는 유체 공급 플레이트이다. 이러한 기관(100)은 상기 마이크로 유체 주입채널(210), 마이크로 유체 분지채널들(220) 및 마이크로 유체 출구채널들(230)을 내부에 형성하기 위해 소정의 두께를 갖는다. 일 예로, 기관(100)은 소정의 길이를 갖는 직사각형의 플레이트 형상으로 이루어진 상판(100a) 및 하판(100b)으로 이루어질 수 있다. 이러한 경우, 마이크로 유체 주입채널(210), 마이크로 유체 분지채널들(220) 및 마이크로 유체 출구채널들(230)은 상판(100a) 또는 하판(100b)에 형성될 수 있고, 바람직하게는 웰플레이트들(310)에 유체의 공급을 원활히 하기 위해 상판(100a)의 하면에 형성될 수 있다. 상판(100a) 및 하판(100b)은 포개져서 일체화될 수 있다. 다른 예로서, 기관(100)은 일체형이고, 상기 채널들은 기관 내부에 형성될 수 있다.
- [58] 마이크로 유체 주입채널(210)은 기관(100) 내로 주입되는 유체를 기관(100)의 평면 방향에 따라 가이드하도록 구성된다. 예를 들면, 마이크로 유체 주입채널(210)은 기관(100)을 구성하는 직사각형 플레이트 형상의 상판(100a)의 하면에 음각 가공되어 직사각형 플레이트 형상의 장축 방향으로 유체를 가이드하도록 구성될 수 있다.
- [59] 마이크로 유체 분지채널들(220)은 마이크로 유체 주입채널(210)을 따라 흐르는 유체를 마이크로 유체 출구채널들(230)을 향해 소정의 유량으로 나누어 공급한다. 이를 위해, 마이크로 유체 분지채널들(220)은 마이크로 유체 주입채널(210)에 분지된 둘 이상의 채널로 이루어질 수 있고, 이때 각각의 마이크로 유체 분지채널들(220)은 마이크로 유체 주입채널(210)로부터 마이크로 유체 출구채널들(230)을 향해 연장된다.
- [60] 이러한 마이크로 유체 분지채널들(220)은 서로 길이가 상이하여 푸아죄유(poiseuille) 법칙에 따라 각 분지 채널간의 유량이 상이하도록 구성될 수 있다. 푸아죄유 법칙은 앞서 설명한 수학식1과 같다.
- [61] 푸아죄유 법칙에 따라, 마이크로 채널의 길이 별로 상이한 유량이 공급된다. 즉, 마이크로 유체 주입채널(210)을 통해 흐르는 유체는 마이크로 유체 분지채널들(220)로 나뉘어 유입되는데 각 마이크로 유체 분지채널(220)의 길이에 따라 나뉘어 유입되는 유량이 차이가 난다.
- [62] 마이크로 유체 분지채널들(220)은 푸아죄유 법칙에 따라 설계되어, 마이크로 유체 분지채널들(220)의 유량이 주입채널의 유체의 흐름 방향에 따른 순서에

대해 선형 증가 또는 선형 감소하도록, 각각의 마이크로 유체 분지채널(220)의 길이를 구성시킬 수 있다.

- [63] 예를 들면, 마이크로 유체 분지채널들(220)은 4개로 이루어질 수 있고, 4개의 마이크로 유체 분지채널(220) 각각의 길이는 유체의 흐름 방향에 따라 순차적으로 69mm, 40mm, 21mm, 16mm로 설정될 수 있고, 이러한 경우 69mm의 채널은 40%의 유량을, 40mm의 채널은 30%의 유량을, 21mm의 채널은 20%의 유량을, 16mm의 채널은 10%의 유량을 공급하도록 유체의 공급 유량이 선형 감소하는 형태로 구성될 수 있다.
- [64] 이러한 마이크로 유체 분지채널들(220)의 설계는 각 웰플레이트(310)의 공급 영양분의 비교 평가를 용이하게 한다.
- [65] 마이크로 유체 출구채널들(230)은 마이크로 유체 분지채널들(220)을 따라 이동하는 유체를 웰플레이트들(310) 방향으로 배출한다. 이를 위해, 마이크로 유체 출구채널들(230)은 각 마이크로 유체 분지채널(220)의 종단부에서 기관(100)의 상면 방향으로 연장되어 기관(100)을 상면을 관통하여 관통개구를 형성한다. 이러한 마이크로 유체 출구채널들(230)은 유체의 흐름 방향을 따라 배열된다.
- [66] 한편, 기관(100)은 유체를 기관(100)의 내부로 공급하는 시점부터 웰플레이트들(310)까지 유체가 계속 공급되기 위해 유입채널(110) 및 캐비티(120)를 포함한다.
- [67] 유입채널(110)은 마이크로 유체 주입채널(210)로 유체를 주입하기 위한 채널이다. 일 예로, 유입채널(110)은 기관(100)의 측면으로부터 기관(100)의 내부를 향해 연장된 유체주입구(111) 및 유체주입구(111)의 끝으로부터 마이크로 유체 주입채널(210)을 향해 관통된 개구(112)를 포함할 수 있다. 유체주입구(111)는 마이크로 유체 주입채널(210)보다 높게 위치할 수 있고, 유체의 공급을 위한 호스와 연결되는 어댑터가 결합될 수 있도록 내면에 나사산을 형성하는 형태일 수 있다.
- [68] 캐비티(120)는 마이크로 유체 출구채널들(230)로부터 배출되는 유체가 모이는 공간이다. 캐비티(120)는 마이크로 유체 출구채널들(230)의 개수와 동일한 개수일 수 있고, 각각의 캐비티(120)는 마이크로 유체 출구채널들(230)의 위로 위치하도록 기관(100)의 상면에 형성된다. 이때, 캐비티(120)의 최장 너비는 웰플레이트(310) 하면의 최단 너비보다 작아 웰플레이트(310)가 캐비티(120) 위에 위치하면서 웰플레이트(310) 하면과 캐비티(120) 내면이 이루는 공간을 형성하며, 마이크로 유체 출구채널들(230)에 의한 관통개구들은 캐비티(120)의 내면에 형성된다. 이에 의해 캐비티(120) 내에 마이크로 유체 출구채널들(230)로부터 배출되는 유체가 저장될 수 있다.
- [69] 웰플레이트들(310)은 배양을 위한 세포가 저장되며, 상기 마이크로 유체 주입채널(210), 마이크로 유체 분지채널들(220) 및 마이크로 유체 출구채널들(230)을 통해 세포 배양에 필요한 유체를 공급받는다. 이를 위해,

웰플레이트들(310)은 마이크로 유체 출구채널들(230)의 개수와 동일한 개수를 이루어 기판(100)의 상면에 위치하고 각각의 마이크로 유체 출구채널들(230)과 유체 소통가능하도록 연결된다. 도 6은 도 1에 도시된 기판 상에 세포 배양 키트가 결합된 상태를 나타낸 단면도로써, 이러한 모습은 도 6에 잘 나타나 있다.

[70] 이러한 웰플레이트들(310)은 웰플레이트(310)의 하면을 구성하는 바닥판(311) 및 바닥판(311)으로부터 수직하게 연장된 측벽(312)을 포함할 수 있다.

웰플레이트들(310)은 웰플레이트들(310) 내의 배양물이 배출되도록 측벽(312)의 상단에 개구(312a)가 형성되며, 바닥판(311)에 하나 이상의 개구(311a)를 포함할 수 있고, 하나 이상의 개구(311a)는 기판(100)의 캐비티(120)와 유체 소통 가능하게 연결되어 하나 이상의 개구(311a)를 통해 캐비티(120) 내의 유체가 웰플레이트들(310)로 유입될 수 있다.

[71] 한편, 이러한 웰플레이트들(310)은 하나의 세포 배양 키트(300)로서 제공될 수 있다. 세포 배양 키트(300)는 세포 배양을 위한 다수의 셀(cell)을 구성하는 형태일 수 있다. 세포 배양 키트(300)를 전체를 구성하는 셀들 중 일부는 마이크로 유체 출구채널들(230)과 연결되는 웰플레이트들(310)로 구성될 수 있고, 나머지 셀들 중 일부는 웰플레이트들(310)의 측벽(312)의 상단의 개구(312a)를 통해 배출되는 배양물을 공급받는 배양물수용셀(320)을 구성할 수 있다. 상기 배양물수용셀(320)은 웰플레이트들(310)과 동일한 형태를 이루도록 바닥판(321) 및 측벽(322)을 포함하는 형태일 수 있고, 예를 들면 2개일 수 있고, 각각의 배양물수용셀(320)의 바닥판(321)에는 공급된 배양물을 배출하는 배출구멍(321a)이 형성될 수 있다.

[72] 이러한 경우, 도 1에 도시된 바와 같이 웰플레이트들(310)은 세포 배양 키트(300)의 다수의 셀들 중 가운데의 1열을 구성하도록 배치될 수 있고, 상기 배양물수용셀(320)은 다른 열에 배치될 수 있다. 이때, 배양물수용셀들(320)의 측벽(322)에는 측벽(322)의 상단으로부터 바닥판(321)까지 절개하여 형성된 개구(322a)가 형성될 수 있고, 배양물수용셀들(320)이 배치된 열과 웰플레이트들(310)의 열 사이의 바닥은 막혀 있을 수 있고, 웰플레이트들(310)의 측벽(312)에 형성된 개구(312a)는 배양물수용셀들(320)을 향하도록 배치되고 배양물수용셀들(320)의 측벽(322)에 형성된 배출구멍(322a)은 웰플레이트들(310)을 향하도록 배치될 수 있다. 이러한 구조에 의해 웰플레이트들(310)로부터 배출되는 배양물은 배양물수용셀들(320)의 내측으로 유입될 수 있다.

[73] 이와 같이 본 발명은 마이크로 유체 채널들을 통해 세포 배양에 필요한 영양분 및 산소가 웰플레이트들(310)로 공급되고 웰플레이트들(310)에서는 세포가 배양된다. 또한 웰플레이트들(310) 상단의 배출수단을 통해 웰플레이트들(310)의 배양물을 배출한다. 이처럼 유체는 마이크로채널들로 계속 공급되고 배출수단을 통해 계속 배출되는 관류 시스템을 제공할 수 있다.

[74] 그런데 이러한 관류 시스템을 통한 유체의 공급 과정에서 유체에 포함된

기포가 마이크로채널들 내로 들어가게 되면 채널 막힘 현상이 발생할 뿐만 아니라, 의도하지 않은 저항이 마이크로채널들에 발생하기 때문에 정확한 농도 분포로 유체를 공급하기 어려워질 수 있다. 이를 방지하기 위해, 기관(100)은 버블트랩(130)을 포함한다.

[75] 버블트랩(130)은 유입채널(110)을 통해 주입되는 유체에 포함된 기포를 수용하는 공간이다. 버블트랩(130)은 마이크로 유체 주입채널(210)의 경로 상에 위치할 수 있다. 예를 들면, 버블트랩(130)은 마이크로유체를 주입하는 유입채널(110) 및 마이크로 유체 주입채널(210)의 사이에 배치되도록 유입채널(110)에 연결되는 마이크로 유체 주입채널(210)의 끝에 위치할 수 있고, 이때 버블트랩(130)은 마이크로 유체 주입채널(210)보다 높게 형성될 수 있다.

[76] 이러한 버블트랩(130)에 의해, 유입채널(110)로부터 마이크로 유체 주입채널(210)로 주입되는 유체 내에 기체(버블)이 포함된 경우 그 버블 기체는 버블트랩(130)과 만나게 되어 버블 기체는 버블트랩(130) 내로 상승해 빠져나가고 유체는 마이크로 유체 주입채널(210) 내로 이동하게 된다.

[77] 본 발명의 다른 실시예에 따라 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템은 제2 마이크로 유체 주입채널(240), 제2 마이크로 유체 분지채널들(250), 제2 유입채널(140) 및 제2 버블트랩(150)을 포함한다.

[78] 제2 마이크로 유체 주입채널(240)은 상기 마이크로 유체 주입채널(210)과 같이 기관(100) 내로 주입되는 유체를 기관(100)의 평면 방향에 따라 가이드하도록 구성된다. 제2 마이크로 유체 주입채널(240)은 기관(100) 내에서 상기 주입채널(210)이 위치하지 않은 다른 측에 위치할 수 있거나, 동일 측인 경우 웰플레이트가 놓이는 행을 사이에 두는 위치일 수 있다. 제2 마이크로 유체 주입채널(240)은 상기 마이크로 유체 주입채널(210)과 평행하며, 기관(100)을 구성하는 직사각형 플레이트 형상의 상판(100a)의 하면에 음각 가공되어 직사각형 플레이트 형상의 장축 방향으로 유체를 가이드할 수 있다. 일 예로, 제2 마이크로 유체 주입채널(240)은 상기 마이크로 유체 주입채널(210)을 따라 흐르는 유체의 흐름 방향과 반대 방향으로 유체를 가이드할 수 있다.

[79]

[80] *제2 마이크로 유체 분지채널들(250)은 제2 마이크로 유체 주입채널(240)을 따라 흐르는 유체를 마이크로 유체 출구채널들(230)을 향해 소정의 유량으로 나누어 공급한다. 이를 위해, 제2 마이크로 유체 분지채널들(250)은 제2 마이크로 유체 주입채널(240)에 분지된 둘 이상의 채널로 이루어질 수 있고, 이때 각각의 제2 마이크로 유체 분지채널들(250)은 제2 마이크로 유체 주입채널(240)로부터 마이크로 유체 출구채널들(230)을 향해 연장된다. 즉, 제2 마이크로 유체 분지채널들(250)의 중단부는 상기 마이크로 유체 분지채널들(220)의 중단부와 합류되어, 상기 마이크로 유체 출구채널들(230)에 유체 소통 가능하도록 연결된다.

[81] 이러한 제2 마이크로 유체 분지채널들(250)은 서로 길이가 상이하여 푸아죄유

법칙에 따라 각 분지 채널간의 유량이 상이하도록 구성될 수 있다. 즉, 제2 마이크로 유체 분지채널들(250)로의 유량이 제2 마이크로 유체 주입채널(240)의 유체의 흐름 방향에 따른 순서에 대해 선형 증가 또는 선형 감소하도록, 각각의 제2 마이크로 유체 분지채널의 길이가 구성될 수 있다. 이러한 제2 마이크로 유체 분지채널들(250)의 구성 형태는 상기 마이크로 유체 분지채널들(220)의 구성 형태와 동일하므로 이에 대한 구체적인 설명은 생략하기로 한다.

- [82] 제2 유입채널(140)은 제2 마이크로 유체 주입채널(240)로 유체를 주입하기 위한 채널이다. 일 예로, 제2 유입채널(140)은 기관(100)의 다른 측면, 즉 상기 유입채널(110)이 형성된 측면의 반대편에 위치한 측면으로부터 기관(100)의 내부를 향해 연장된 제2 유체주입구(141) 및 제2 유체주입구(141)의 끝으로부터 제2 마이크로 유체 주입채널(240)을 향해 관통된 제2 개구(142)를 포함할 수 있다. 제2 유체주입구(141)의 형태는 상기 유체주입구(111)의 형태와 동일하므로 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [83] 제2 버블트랩(150)은 제2 유입채널(140)을 통해 주입되는 유체에 포함된 기포를 수용하는 공간이다. 제2 버블트랩(150)은 제2 마이크로 유체 주입채널(240)의 경로 상에 위치할 수 있다. 예를 들면, 제2 버블트랩(150)은 마이크로유체를 주입하는 제2 유입채널(140) 및 제2 마이크로 유체 주입채널(240)의 사이에 배치되도록 제2 유입채널(140)에 연결되는 제2 마이크로 유체 주입채널(240)의 끝에 위치할 수 있고, 이때 제2 버블트랩(150)은 제2 마이크로 유체 주입채널(240)보다 높게 형성될 수 있다.
- [84] 이러한 제2 버블트랩(150)에 의해, 제2 유입채널(140)로부터 제2 마이크로 유체 주입채널(240)로 주입되는 유체 내에 기체(버블)이 포함된 경우 그 버블 기체는 제2 버블트랩(150)과 만나게 되어 버블 기체는 제2 버블트랩(150) 내로 상승해 빠져나가고 유체는 제2 마이크로 유체 주입채널(240) 내로 이동하게 된다.
- [85] 이러한 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 이용하면, 세포 배양에 필요한 영양분 및 산소를 세포를 배양하는 각각의 웰플레이트(310) 내로 서로 다른 정확한 농도 분배로 제공할 수 있고, 서로 다른 농도로 분배되어 공급된 유체의 유량에 의해 배양되는 각 세포의 증식을 관찰하고 정량적으로 평가할 수 있다.
- [86] 도 10, 도 19 및 도 20은 혼합 채널을 더 포함하는 본 발명의 시스템을 예시한다. 도 20은 도 19가 결합된 상태를 예시한다. 도 10은 상기 분지 채널의 모습을 확대해서 예시한다. 상기 분지채널 종단부 및 상기 제2 분지채널의 종단부의 합류지점부터 상기 마이크로유체 출구채널까지 혼합 채널(1010)을 추가로 더 포함한다. 혼합 채널(1010)은 유체주입채널들과 분지채널들과 같은 수준에 위치될 수 있고, 혼합 채널의 종단은 상기 출구채널의 시작지점과 연결되고 출구채널은 기관의 두께 방향으로 연장되어 기관의 상면을 관통한다.
- [87] 상기 혼합 채널은 곡류(Meander) 구간을 포함한다. 곡류 구간은 도 10에서 예시되는 바와 같이 구불구불 형상을 가진 구간을 의미하며, 두 채널로 유입된

상이한 유체의 혼합을 용이하게 하여, 혼합 채널의 길이를 줄일 수 있다.

- [88] 혼합 채널이 직선형상인 경우, 120 mm의 채널을 디자인하여 설계대로 혼합이 이루어지는지 확인한 결과, 도 11에서 확인 되는 바와 같이, 120 mm 부근에서 C.V(Coefficient of variation, 변동계수)가 5% 이하로 균일하게 혼합되는 것을 확인할 수 있지만, 채널의 길이가 길어지는 단점이 있다. 그러나 곡류 형태의 혼합 채널의 경우, 굽어지는 형상에 의해, 채널 내의 유동(유체의 대류)에 따른 혼합이 추가로 적용되어, 60 mm 부근에서, C.V가 5% 이하로 떨어져, 균일하게 혼합되는 것을 확인할 수 있다. 즉, 곡류 형태의 혼합 채널을 적용할 경우, 60 mm의 길이만 적용하여도 균일한 혼합을 볼 수 있으며, 채널의 길이 또한 감소된 장점을 가진다.
- [89] [실시예 1]
- [90] 도 1에서 예시된 시스템을 제작하여 본 발명의 시스템을 평가하였다. 도 7은 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 통해 유체가 서로 다른 유량으로 정확히 공급되는지 여부의 테스트 결과를 나타낸다. 도 7의 테스트를 위해 염색물을 이용하였다.
- [91] 도 7의 (a)는 유입채널(110)을 통해 푸른색의 염색물을 주입한 경우의 테스트 결과를 도시하며, 도시된 바와 같이 마이크로 유체 출구채널들(230)을 통해 각각의 캐비티(120) 내로 나뉘어 토출된 유체의 유량이 유체의 흐름 방향에 따른 순서에 대해 점차 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [92] 도 7의 (b)는 제2 유입채널(140)을 통해 노랑색의 염색물을 주입한 경우를 도시하며, 도시된 바와 같이 마이크로 유체 출구채널들(230)을 통해 각각의 캐비티(120) 내로 나뉘어 토출된 유체의 유량이 유체의 흐름 방향에 따른 순서에 대해 점차 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [93] 도 7의 (c)는 유입채널(110) 및 제2 유입채널(140)을 통해 각각 푸른색의 염색물 및 노랑색의 염색물을 주입한 경우를 도시하며, 도시된 바와 같이 마이크로 유체 출구채널들(230)을 통해 각각의 캐비티(120) 내로 나뉘어 토출된 유체의 유량이 마이크로 유체 주입채널(210)의 흐름 방향 및 제2 마이크로 유체 주입채널(240)의 흐름 방향에 따른 순서에 대해 각각 선형 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [94] 도 8a은 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 통해 유체를 주입한 경우 정확한 농도 분배로 공급되는지 여부의 테스트 결과를 나타낸다. 도 8a의 테스트를 위해 유입채널(110)로는 초순수(DI-water)를 주입하고, 제2 유입채널(140)로는 형광물질인 브롬페놀 블루(Bromphenol blue) 및 초순수가 혼합된 혼합액을 주입하였다.
- [95] 도 8a에 나타난 바와 같이 각각의 웰플레이트에 공급된 유체의 농도 구배가 현저하게 차이가 나는 것이 확인되며, 이는 정확한 농도 분배로 유체가 공급되었음을 확인시킨다.
- [96] 도 8b는 도 8a의 테스트에 따른 각각의 웰플레이트 내의 유체를 정량적 분석한

결과를 나타낸 그래프이다.

[97] 도 8b에 나타난 바와 같이 웰플레이트들 내의 유체의 농도 분배가 선형적으로 증가하였음을 확인할 수 있다.

[98] 이러한 각각의 테스트들을 통해 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템을 이용하면 세포 배양에 필요한 영양분 및 산소를 서로 다른 정확한 유량 및 농도 분배로 공급할 수 있음을 확인할 수 있다.

[99] 한편, 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템은 3차원 관류 세포 배양 실험에 효과적으로 이용될 수 있다. 이를 확인하기 위해, 배양액과 약물(과산화수소수)을 연속적으로 주입하면서 약물의 농도에 따른 세포 사멸 결과를 확인하였다.

[100] 도 9a는 웰플레이트들에 배양액과 약물이 서로 다른 정확한 농도 분배로 주입된 상태를 나타내며, 도 9b는 PI staining을 통해 각 웰플레이트 내의 배양물에서 추출된 DNA의 양을 확인한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 9c는 각 웰플레이트 내로 공급된 약물의 농도에 따라 세포가 함유하고 있던 단백질 정량분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[101] 도 9b에 나타난 바와 같이 고농도의 약물이 가해진 경우일수록 초기에 많은 양의 DNA가 측정된 것을 확인할 수 있다.

[102] 한편, 각 웰플레이트 내의 생존해 있는 세포를 추출하여 BCA 단백질 정량분석을 수행한 결과, 도 9c에 나타난 바와 같이 가해진 약물의 농도에 따라 세포가 함유하고 있던 단백질량이 구별됨을 확인할 수 있다.

[103] [실시예 2]

[104] 두 개의 마이크로 유체 주입 채널을 포함하는 도 19 및 도 20에서 예시된 본 발명의 시스템을 준비하고, 상기 주입 채널에 주입 유량을 정량적으로 주입하기 위해, 도 12의 사진과 같은 시린지 펌프(Harvard PHD 2000)를 이용하였다. 장시간 동안 주입시키기 위해 10 ml 용량의 시린지 2개를 이용하였다. 실리콘 튜브를 이용하여 시린지와 디바이스를 연결하여 실험 준비를 하였다. 또한, 디바이스의 각 웰로부터 나오는 유체를 일정 시간마다 채취하여 형광분석을 할 수 있도록, 피펫과 96웰 플레이트를 준비하였다.

[105] 한 시린지는 초순수(DI water)를 제1 마이크로 유체 주입 채널로 주입하였고, 다른 시린지에는 형광 물질 로다민 110이 용해된 메탄올과 초순수의 혼합물을 제2 마이크로 유체 주입 채널로 주입하였다. 도 13이 참조된다. 펌프의 작동과 동시에 농도 구배 기능이 원활히 작동하도록, 채널 내부를 초순수로 채워 놓았다. 채널이 초순수로 채워져 있지 않을 경우, 버블트랩 내부는 실험 전부터 기포로 가득 찬 환경에 놓이게 되어, 농도 구배의 정상 작동이 이루어지기 어렵다. 따라서, 초순수로 충전되어 있는 환경에서 시린지 펌프를 작동시켜, 로다민 110의 농도 구배 및 버블트랩의 기능을 확인하고자 하였다. 샘플은 80 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 주입하였다. 펌프의 작동 후 로다민 110이 모든 웰에 토출되기 시작했을 때를 기준으로, 매 30분 마다 디바이스의 각 웰에서 150 μl 씩

채취하여 96웰플레이트에 옮겨담았으며, 이는 시간별로 각 웰에서 채취한 샘플을 형광 분석을 수행하기 위함에 있다.

- [106] 샘플의 형광 분석 결과는 광도로 나타나는데, 이 광도만을 가지고 샘플이 가지고 있는 농도량을 판단하기엔 어려움이 있어서, 로다민 110의 광도에 따른 농도를 정량적으로 평가하기 위해, 스탠다드 샘플을 제조하여 형광분석을 수행하였다. 스탠다드 샘플은 로다민 110을 메탄올에 용해 한 후, 초순수와 혼합하여 제조하였다. 스탠다드는 0.1부터 10까지의 농도 비율로 7개의 스탠다드를 제조하였고 도 14에 예시하였다. 이를 형광 분석하여, 제조한 농도[g/ml]에 따른 광도의 데이터를 얻을 수 있었으며 이는 아래 표1에 예시하였다. 이를 그래프로 나타내어 2차 곡선의 검량선을 구하였으며, 근사값은 $R^2 = 0.9977$ 로 확인되었다. 도 15를 통해 제공하였다. 이를 통해, 임의의 샘플의 광도를 본 검량선에 피팅하여, 샘플이 함유하고 있는 농도량을 확인 할 수 있도록 준비하였다.

- [107] [표1]

Concentration ratio	Concentration (g/ml)	Intensity
0	0	10
0.1	0.00248	134
0.3	0.00744	386
0.6	0.01488	630.
1.2	0.02976	1002
2.5	0.062	2243
5	0.124	3556
10	0.248	5968

- [108] FLUOstar OPTIMA microplate reader를 이용하여 96 웰 플레이트 안에 채취한 샘플을 형광분석 하였다. 로다민 110의 여기 파장(excitation wavelength)과 방사 파장(emission wavelength)가 각각 496, 520 nm 인 것을 고려하여, reader의 여기 파장과 방사 파장을 485, 520 nm로 설정하였으며, gain값을 100으로 설정하여 로다민 110의 광도가 측정 가능하도록 하였다.

- [109] 형광 분석 결과 도 16(a)에서와 같이 검량선에 피팅하여 농도 비율로 나타낸 결과는 도 16(b) 와 같다. 6시간의 관류 동안, 전체적으로 각 웰에서 로다민 110의 농도가 선형적으로 구배되며, 그 비율이 시간의 경과에도 유지되는 것을 확인하였다. 실험 셋업 시에는 채널 내부에 초순수를 채워놓으므로 기포가 없는 환경에서 실험을 시작 할 수 있다. 하지만, 장시간 동안 주입을 하면 시린지의 용량이 줄어들어, 시린지 교체가 필요하다. 이러한 교체 과정에서, 시린지와 펌프, 디바이스의 분리가 불가피하고, 이는 시스템 내부로 기포가 들어가게

된다. 버블트랩이 적용되지 않은 디바이스로 실험을 수행한 결과, 채널 내부로 버블이 침투하여 유동 저항으로 작용하였고, 이는 결과적으로 도 17과 같이 농도 구배 조절을 불가능하게 하였다. 반면에 버블트랩을 포함하는 시스템으로 실험을 하였을 경우, 시린지의 교체 이후 주입 유체와 함께 주입되는 기포는 도 18에서와 같이 버블트랩에 포집 되는 것을 확인하였으며, 또한 앞서 실험한 결과(도 16(b))와 같이, 장시간의 관류 중에도 농도 구배 시스템이 안정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[110] 이러한 본 발명에 따른 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템은 다양한 세포 배양 및 세포 증식의 관찰이 가능하며, 세포 증식의 정량적인 평가가 가능하다. 예를 들면, 생체 내부의 미세환경을 모사하여 생체 내부에서의 종양 증식을 관찰하고 정량적으로 평가 가능하다.

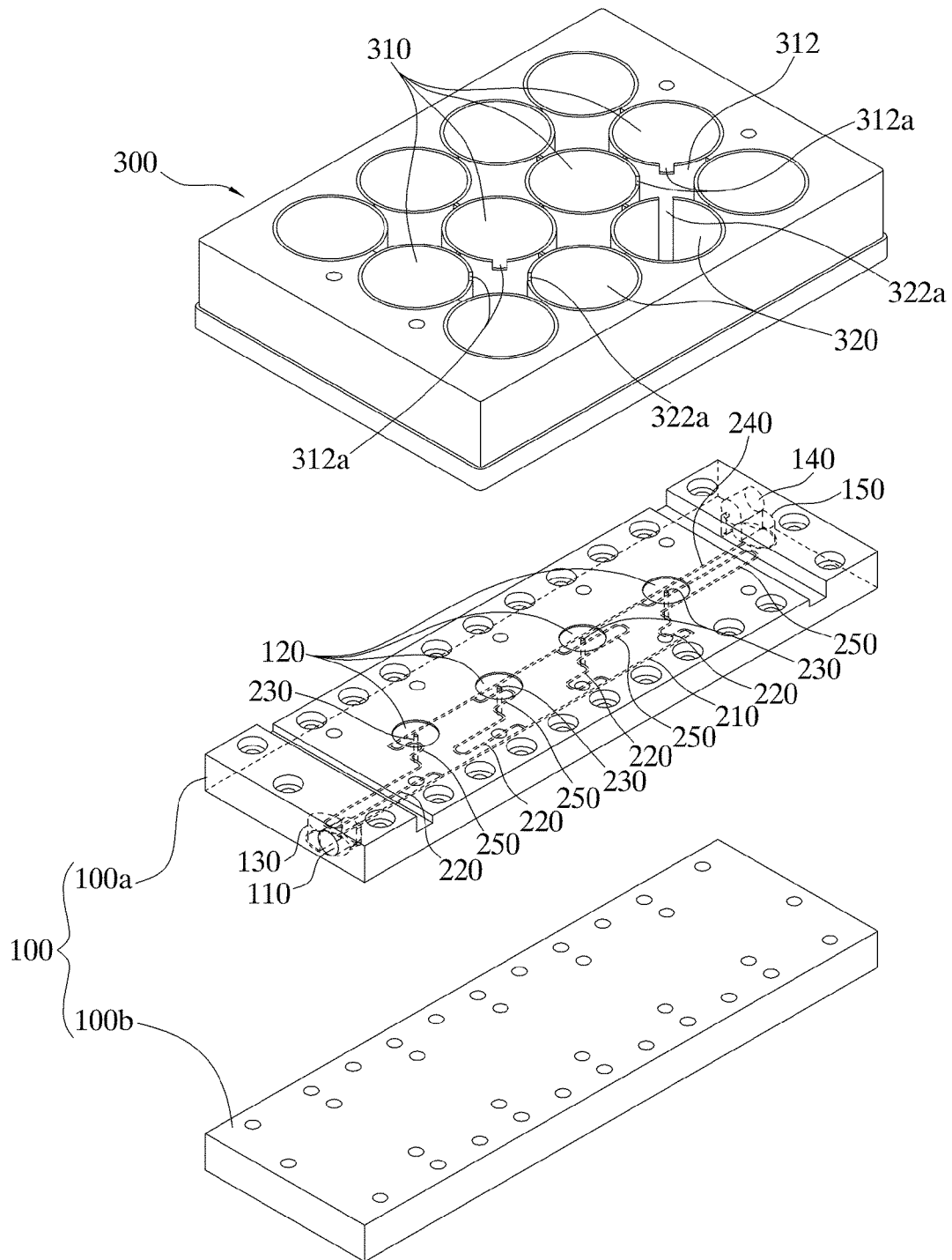
[111] 제시된 실시예들에 대한 설명은 임의의 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 이용하거나 또는 실시할 수 있도록 제공된다. 이러한 실시예들에 대한 다양한 변형들은 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이며, 여기에 정의된 일반적인 원리들은 본 발명의 범위를 벗어남이 없이 다른 실시예들에 적용될 수 있다. 그리하여, 본 발명은 여기에 제시된 실시예들로 한정되는 것이 아니라, 여기에 제시된 원리들 및 신규한 특징들과 일관되는 최광의의 범위에서 해석되어야 할 것이다.

청구범위

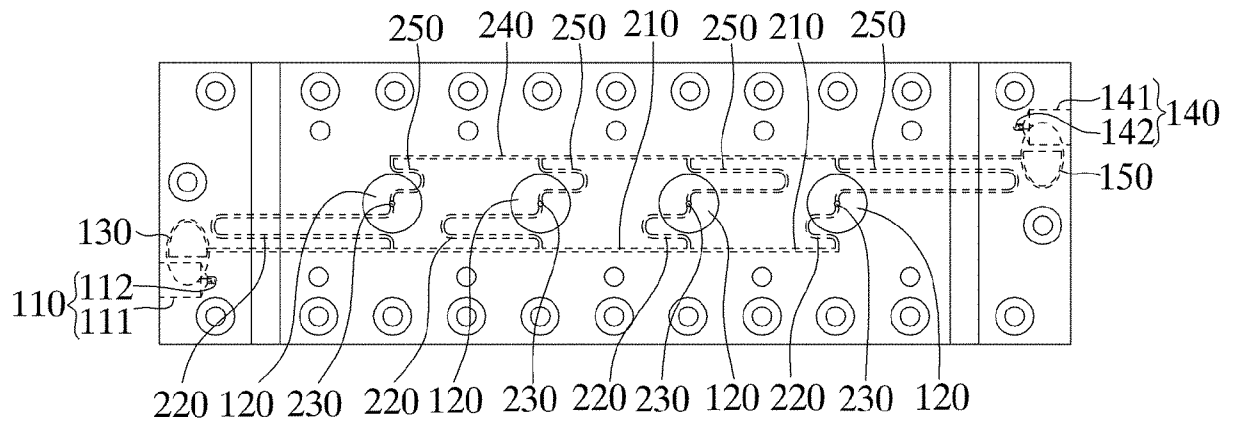
- [청구항 1] 기관;
상기 기관 내에 상기 기관의 평면 방향에 따라 유체를 가이드하도록
구성된 마이크로 유체 주입채널;
상기 기관 내에 상기 마이크로 유체 주입 채널에 분지된 둘 이상의
마이크로 유체 분지채널들;
상기 각 분지채널의 종단부에서 상기 기관의 상면 방향으로 연장되어
상기 기관의 상면을 관통하여 관통개구를 형성하는 마이크로 유체
출구채널들; 및
상기 기관의 상면에 위치하고 상기 각 출구채널과 유체 소통가능하도록
연결된 웰플레이트들을 포함하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 분지채널들은 서로 길이가 상이하여 푸아죄유(poiseuille) 법칙에
따라 각 분지 채널간의 유량이 상이하도록 구성된,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 분지채널로의 유량이 상기 주입채널의 유체의 흐름 방향에 따른
분지채널의 순서에 대해 선형 증가 또는 선형 감소하도록, 상기 각각의
분지채널의 길이가 구성되어 있음을 특징으로 하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 기관은 상기 주입채널로 마이크로유체를 주입하는 유입채널을
포함하고, 상기 유입채널과 상기 주입채널 사이에 버블트랩을 포함하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 기관 상면은 다수의 캐비티(cavity)를 가지며,
상기 출구채널들에 의한 관통개구들은 상기 캐비티의 내면에 형성되어
있고,
상기 웰플레이트 하면은 둘 이상의 구멍을 가지고 있고,
상기 캐비티의 최장 너비는 상기 웰플레이트 하면의 최단 너비보다 작아
상기 웰플레이트가 상기 캐비티 위에 위치하면서 웰플레이트 하면과
캐비티 내면이 이루는 공간을 형성하며, 상기 캐비티에 상기
관통개구로부터 유출된 유체가 저장되고 이 캐비티의 유체가 상기
웰플레이트 하면의 하나 이상의 개구를 통해 상기 웰플레이트로
유입되는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.

- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 웰플레이트는 이의 측벽 상단에 개구를 포함하고,
상기 개구를 통해 웰플레이트의 웰플레이트 배양물이 배출되도록
구성되는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 기판은 상기 웰플레이트 행을 사이에 위치시키고 상기 주입채널과
평행한 제2 마이크로 유체 주입채널 및 상기 제2 마이크로 유체 주입
채널에 분지된 둘 이상의 제2 마이크로 유체 분지채널들을 추가로
포함하며,
상기 제2 분지채널의 종단부는 상기 분지채널의 종단부와 합류되어, 상기
마이크로유체 출구채널에 유체소통가능하게 연결되어 있음을 특징으로
하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 제2 분지채널들은 서로 길이가 상이하여 푸아죄유(poiseuille) 법칙에
따라 각 제2 분지 채널간의 유량이 상이하도록 구성된,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 제2 분지채널로의 유량이 상기 주입채널의 유체의 흐름 방향에 따른
순서에 대해 선형 증가 또는 선형 감소하도록, 상기 각각의 제2
분지채널의 길이가 구성되어 있음을 특징으로 하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 기판은 상기 주입채널로 마이크로유체를 주입하는 유입채널을
포함하고, 상기 유입채널과 상기 주입채널 사이에 버블트랩을 포함하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 분지채널 종단부 및 상기 제2 분지채널의 종단부의 합류지점부터
상기 마이크로유체 출구채널까지 혼합 채널을 추가로 더 포함함을
특징으로 하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.
- [청구항 12] 제8항에 있어서,
상기 혼합 채널은 곡류(Meander) 구간을 포함하는,
관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템.

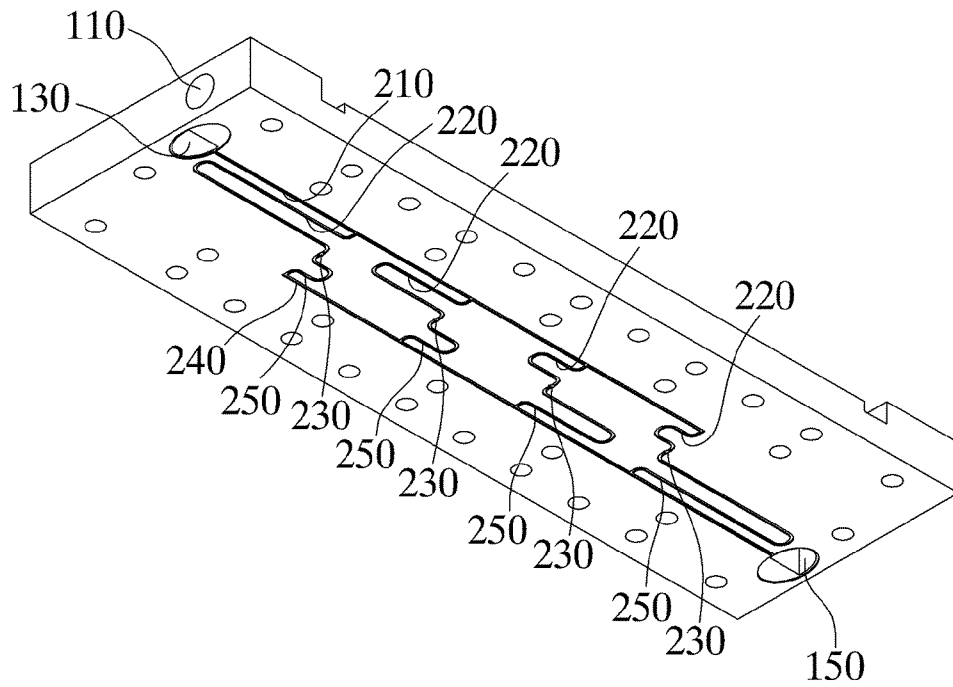
[도1]



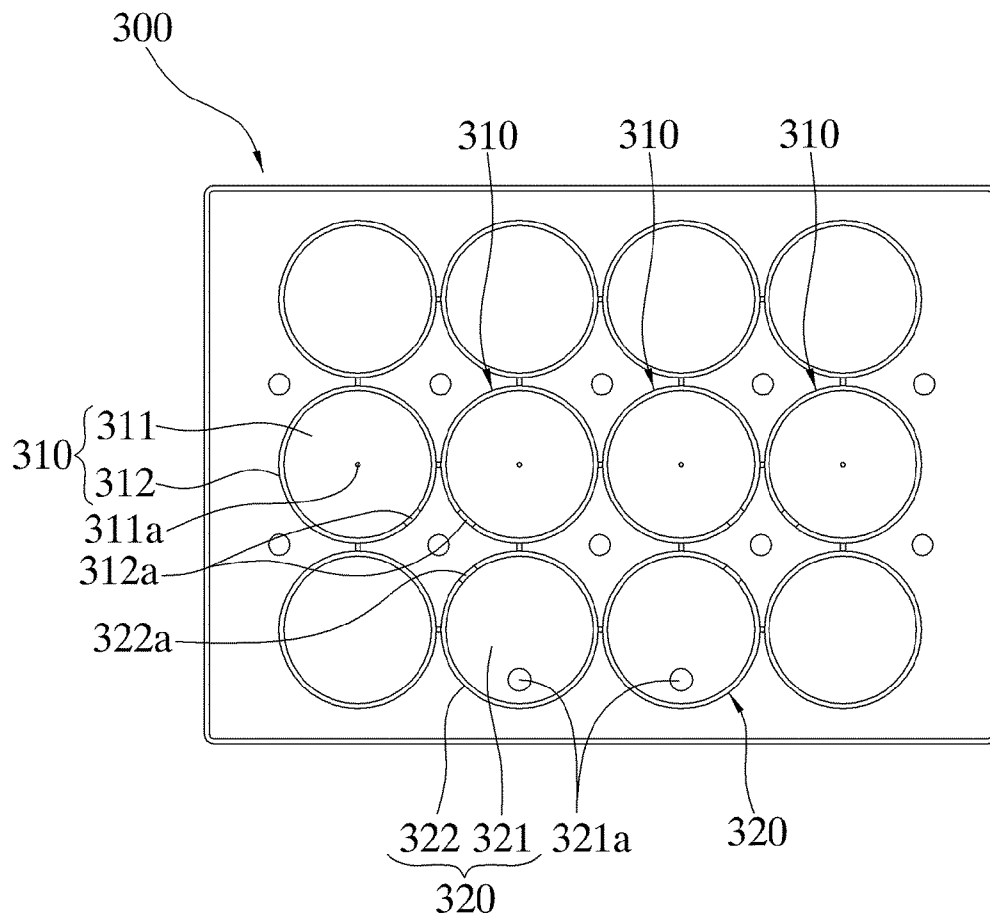
[도2]



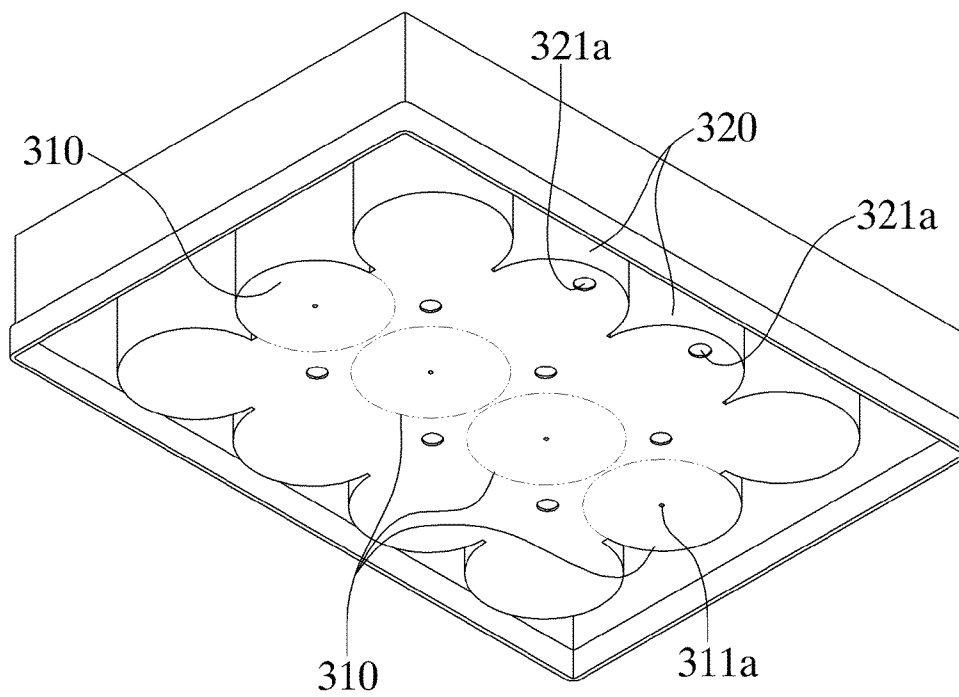
[도3]



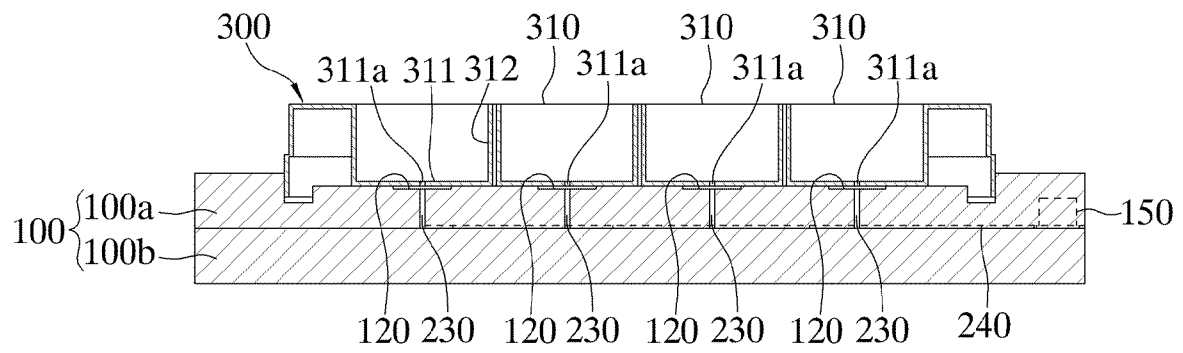
[도4]



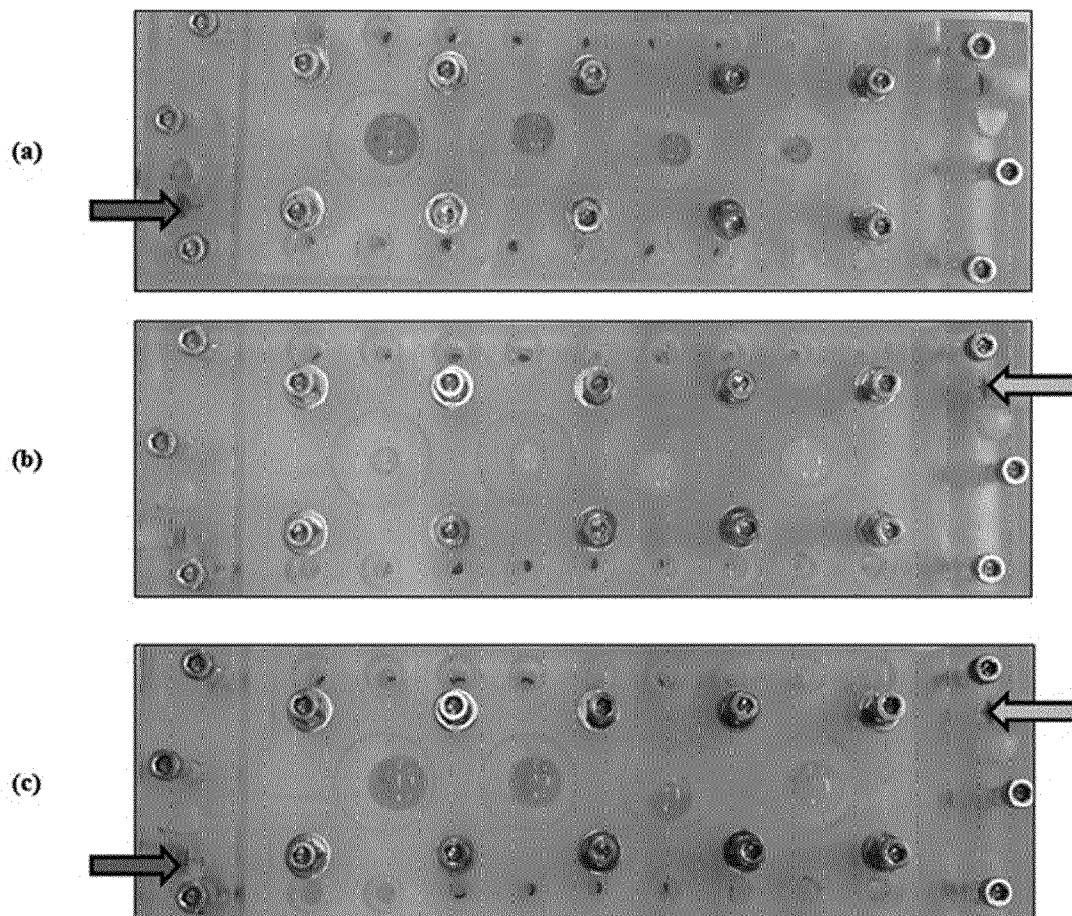
[도5]



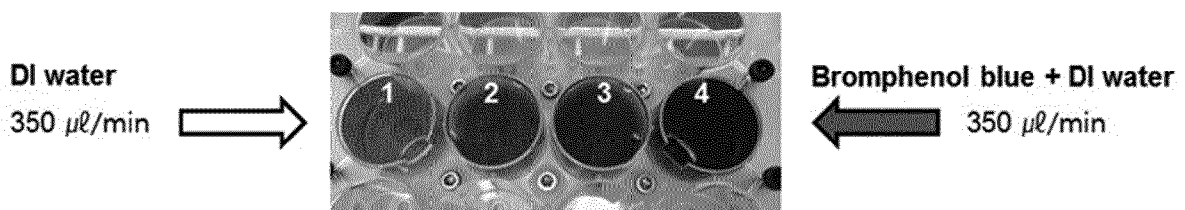
[도6]



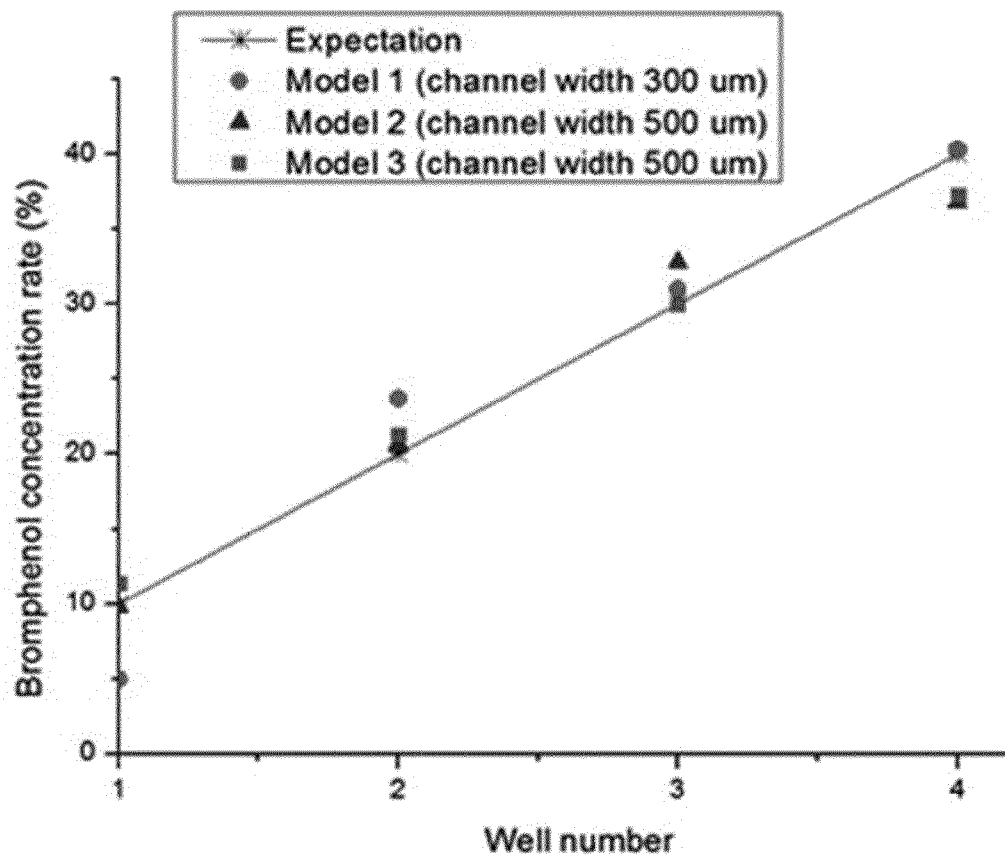
[도7]



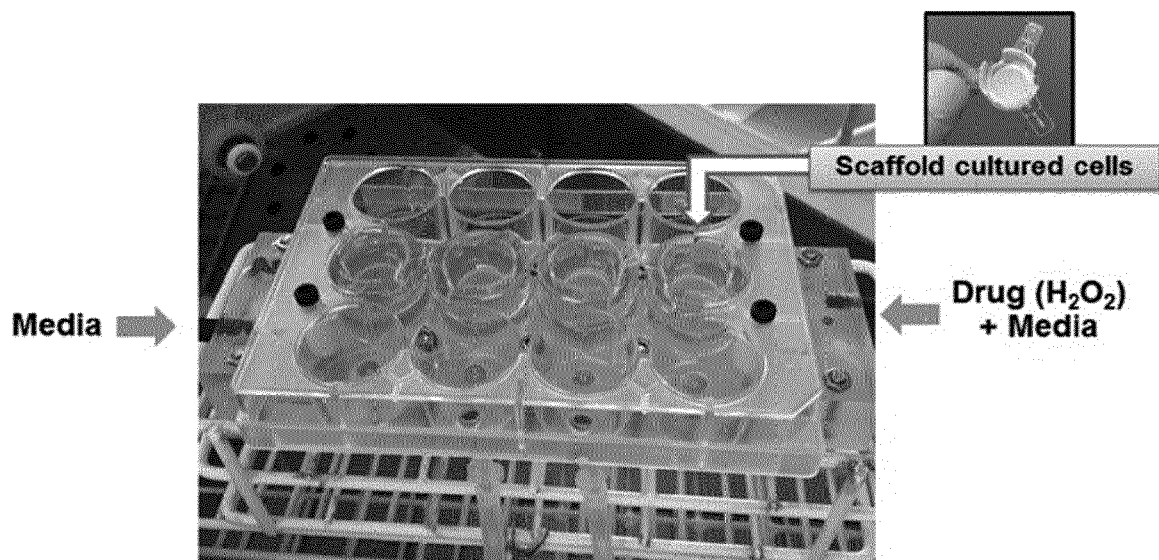
[도8a]



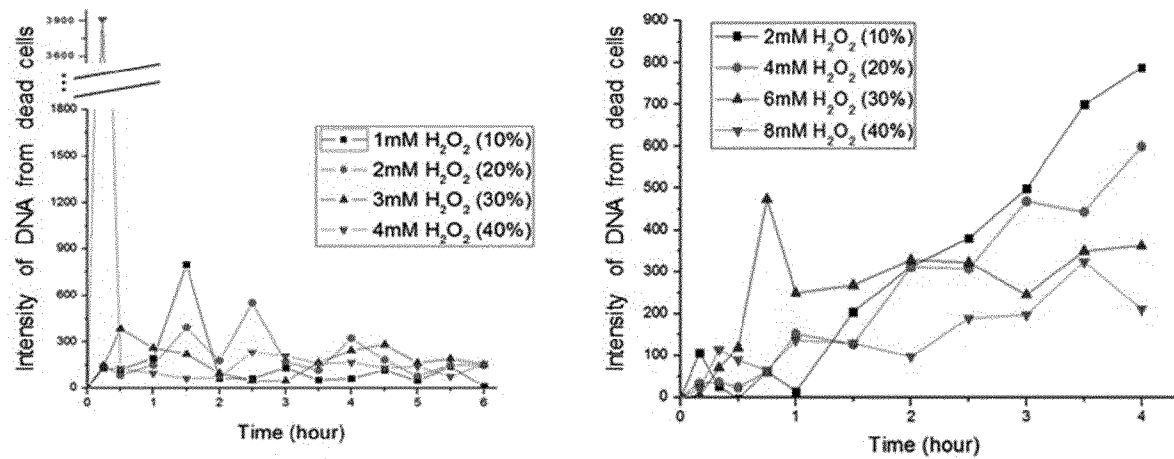
[도8b]



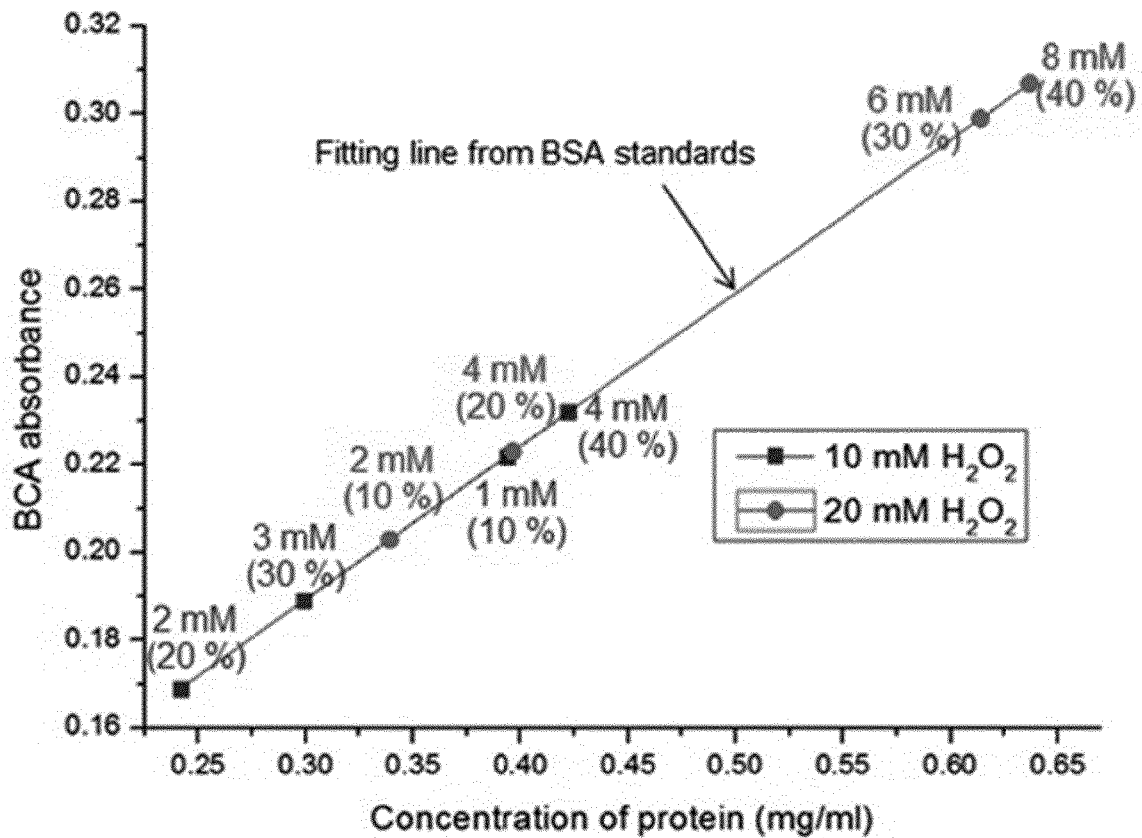
[도9a]



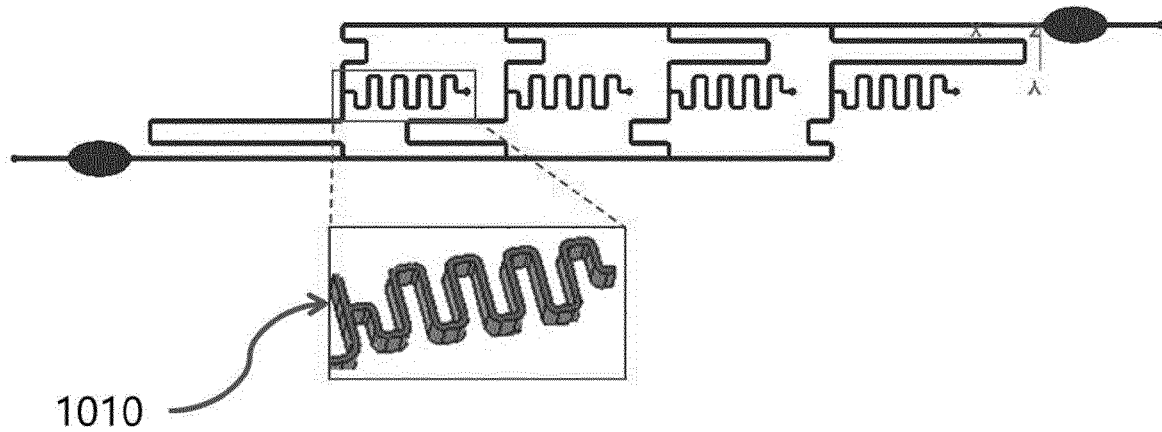
[도9b]



[도9c]



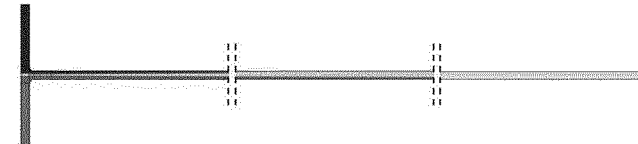
[도10]



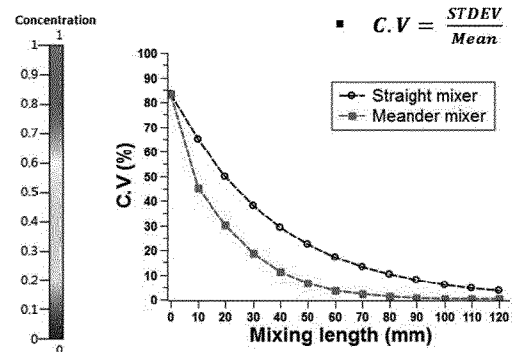
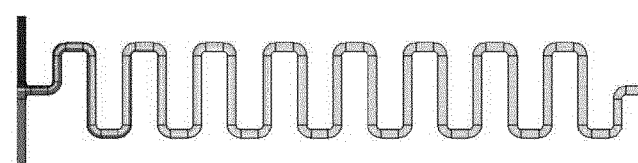
[도11]

◆ 120 mm 길이 믹서의 효율 비교

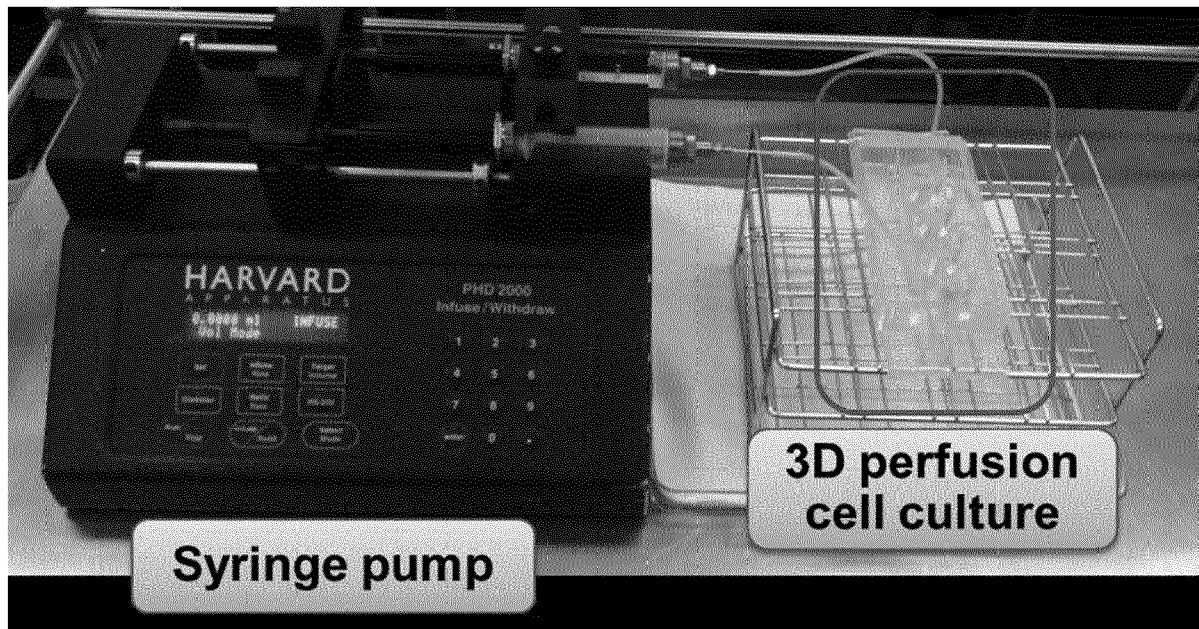
▪ Straight mixer



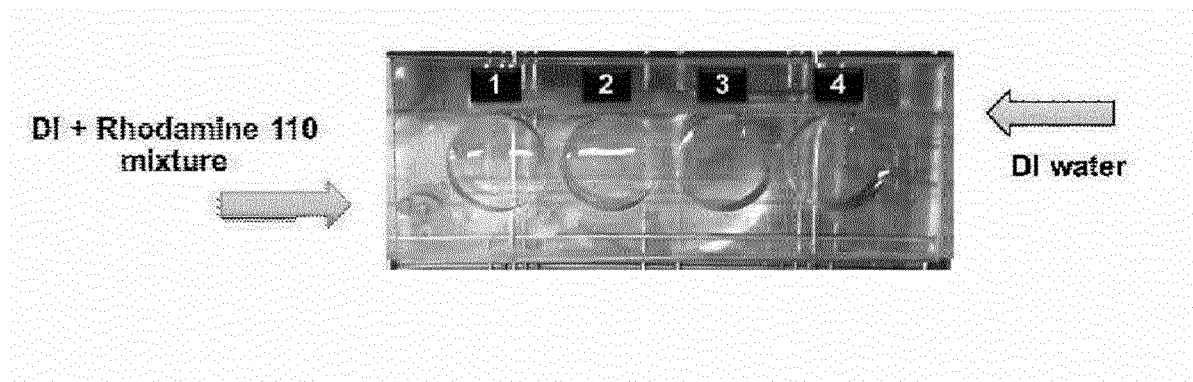
▪ Meander mixer



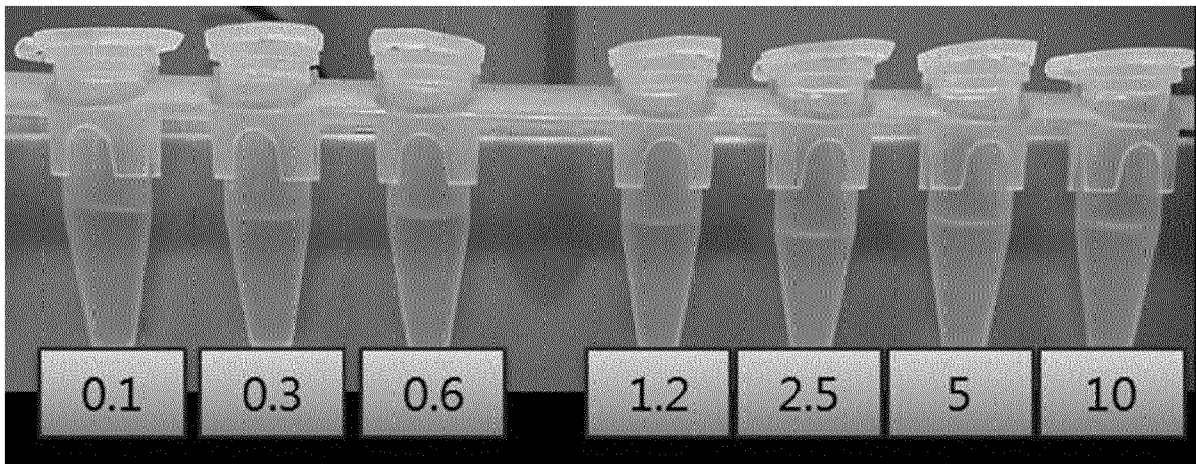
[도12]



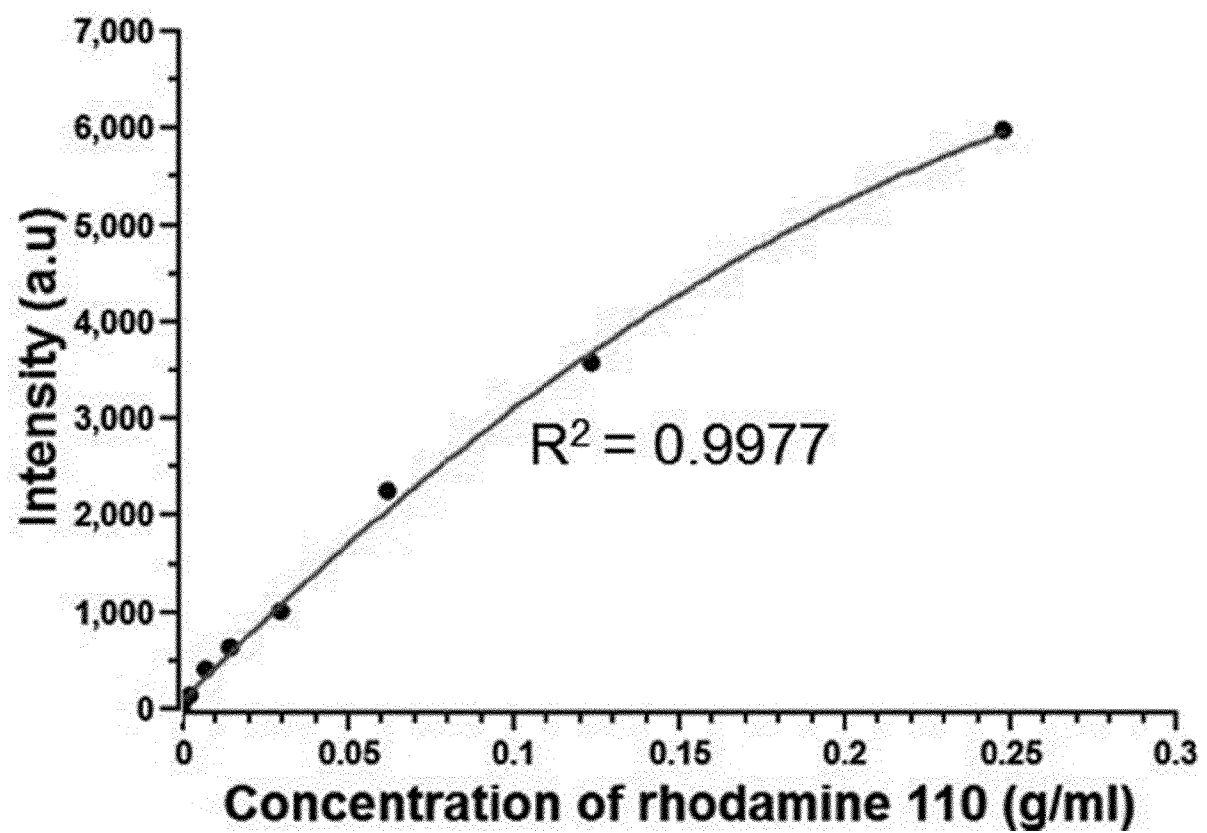
[도13]



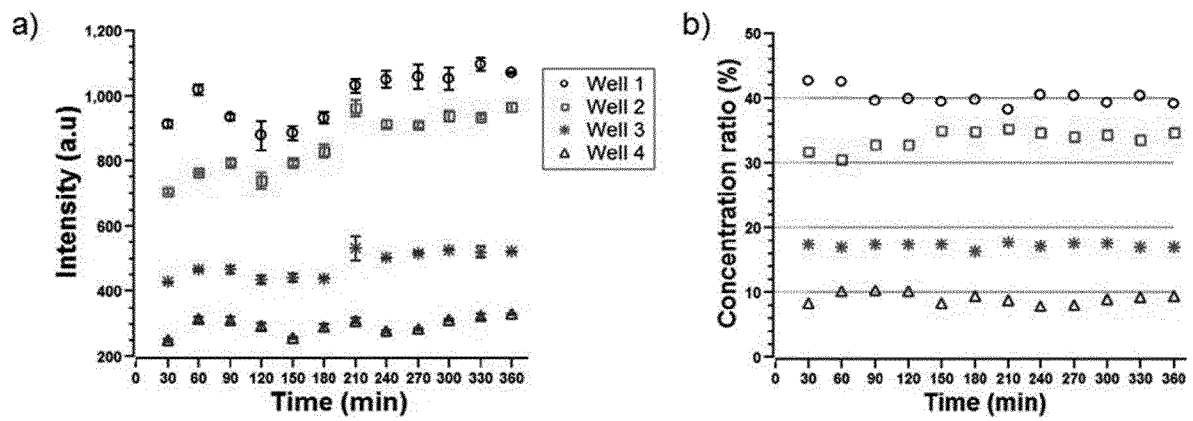
[도14]



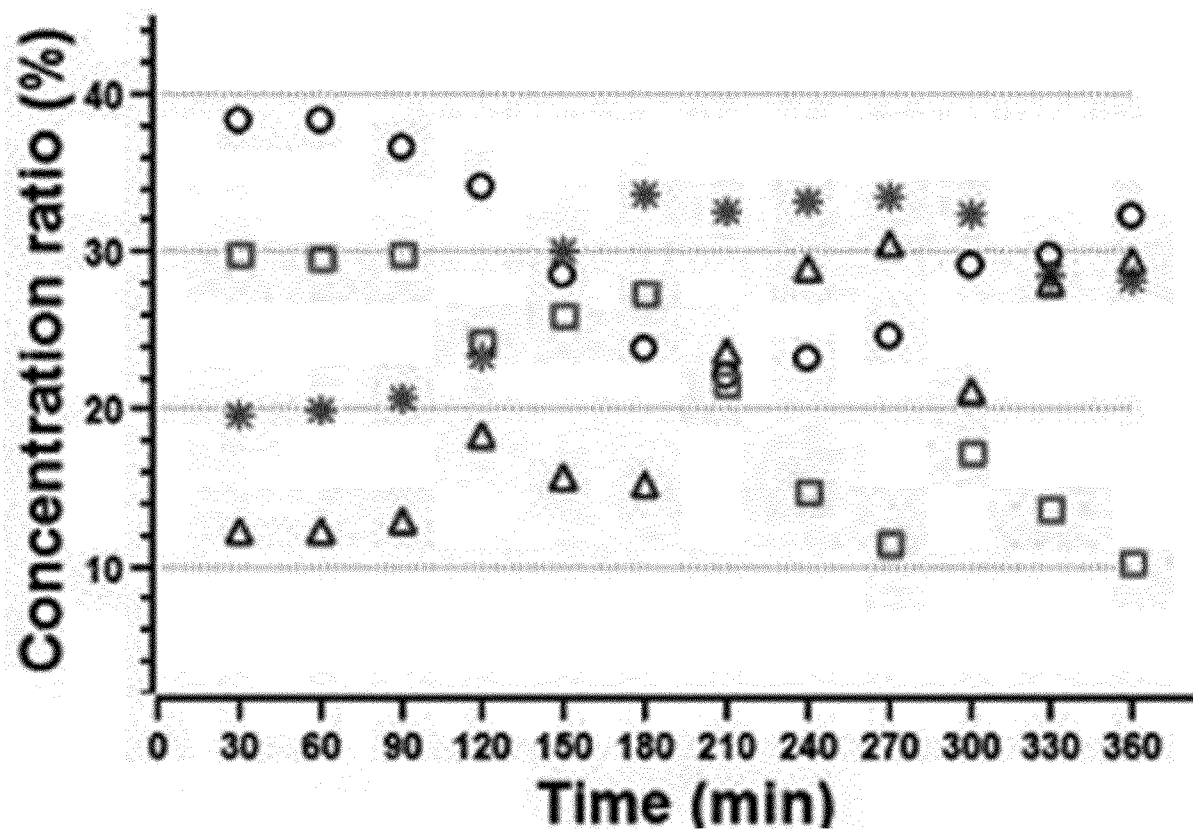
[도15]



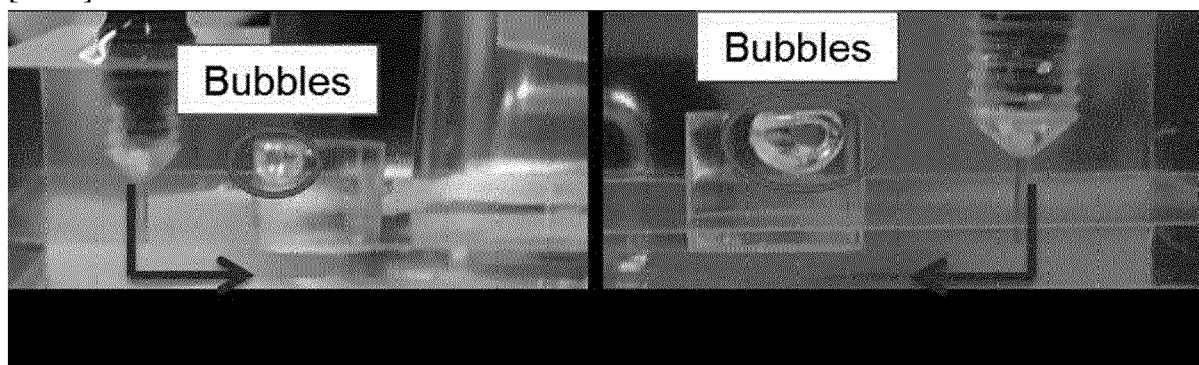
[도16]



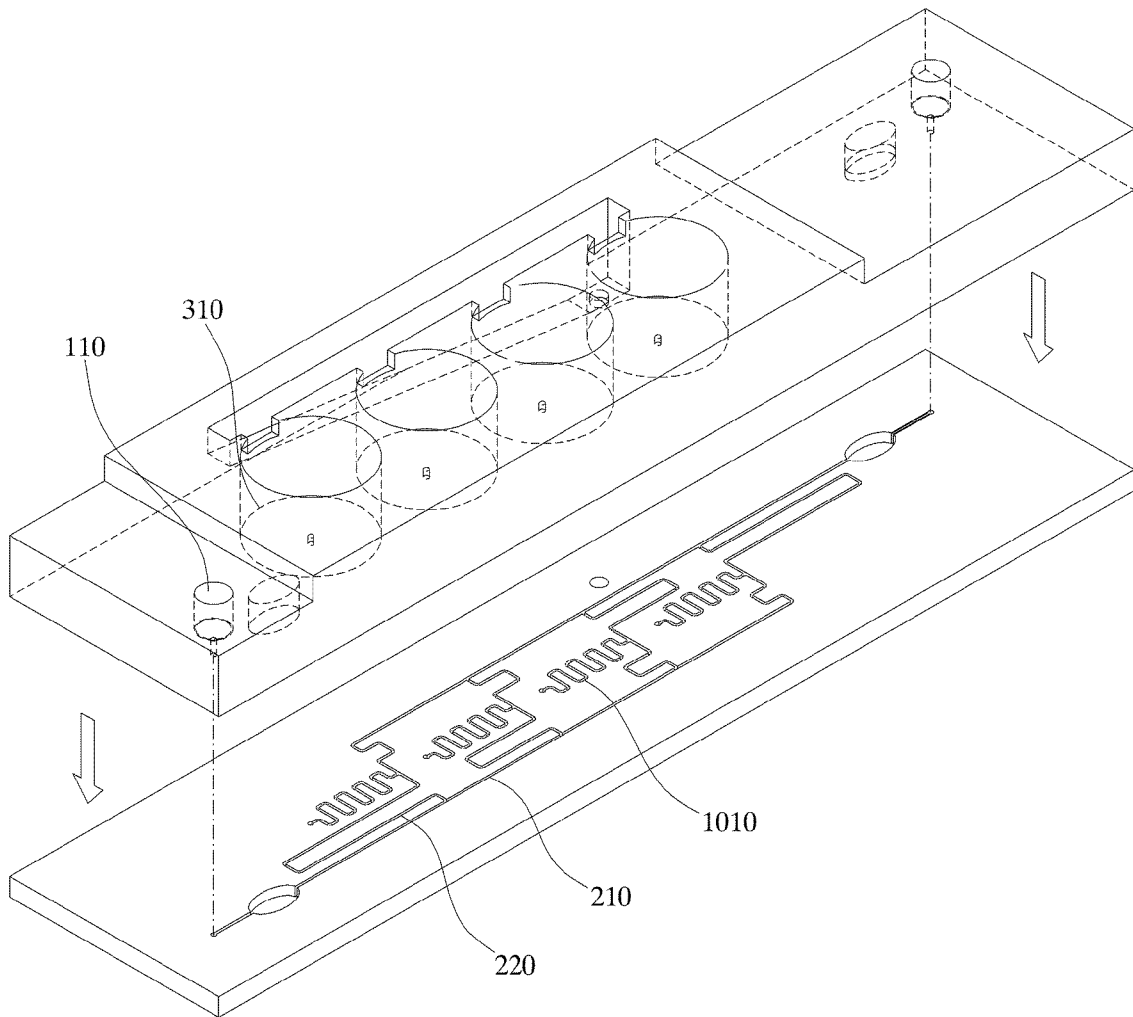
[도17]



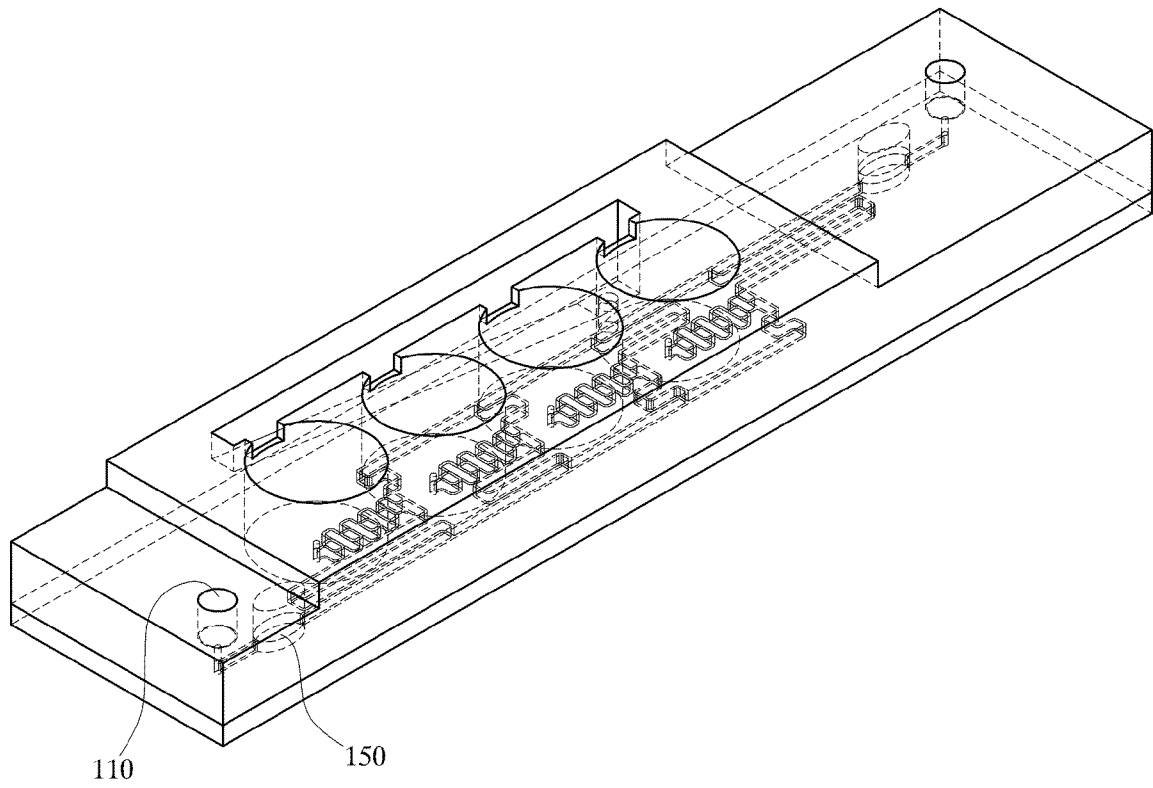
[도18]



[도19]



[도20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/013732**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12M 3/00(2006.01)i, C12M 1/32(2006.01)i, C12M 3/06(2006.01)i, C12M 1/34(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M 3/00; C12M 1/00; C12M 3/02; G01N 33/50; C12M 1/34; C12M 1/32; C12M 3/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: fusion cell culture microfluid system, injection, branch, outlet channel

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0048958 A (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 11 May 2015 See claim 1; paragraphs [0019]-[0023]; figure 3.	1-12
A	KR 10-2015-0098089 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 27 August 2015 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2007-0011068 A (TAKAGI INDUSTRIAL CO., LTD.) 24 January 2007 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2012-0040697 A (UNIVERSITEIT LEIDEN) 27 April 2012 See the entire document.	1-12
A	KR 10-1446526 B1 (QUANTA MATRIX CO., LTD. et al.) 08 October 2014 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 JANUARY 2017 (13.01.2017)

Date of mailing of the international search report

13 JANUARY 2017 (13.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013732

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0048958 A	11/05/2015	KR 10-1575085 B1	08/12/2015
KR 10-2015-0098089 A	27/08/2015	NONE	
KR 10-2007-0011068 A	24/01/2007	CN 1900265 A	24/01/2007
		CN 1900265 C	19/11/2008
		EP 1746154 A1	24/01/2007
		JP 2007-020493 A	01/02/2007
		JP 4689383 B2	25/05/2011
		KR 10-0841189 B1	24/06/2008
		US 2007-0020750 A1	25/01/2007
		US 7892821 B2	22/02/2011
KR 10-2012-0040697 A	27/04/2012	AU 2010-265110 A1	29/12/2010
		CA 2765732 A1	23/12/2010
		CN 102481571 A	30/05/2012
		EP 2442909 A1	25/04/2012
		JP 2012-529896 A	29/11/2012
		US 2012-0164679 A1	28/06/2012
		US 9315768 B2	19/04/2016
		WO 2010-149292 A1	29/12/2010
KR 10-1446526 B1	08/10/2014	CN 105209595 A	30/12/2015
		EP 2987851 A1	24/02/2016
		US 2016-0075985 A1	17/03/2016
		WO 2014-178692 A1	06/11/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12M 3/00(2006.01)i, C12M 1/32(2006.01)i, C12M 3/06(2006.01)i, C12M 1/34(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12M 3/00; C12M 1/00; C12M 3/02; G01N 33/50; C12M 1/34; C12M 1/32; C12M 3/06 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 관류 세포 배양 마이크로 유체 시스템, 주입, 분지, 출구채널																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2015-0048958 A (인하대학교 산학협력단) 2015.05.11 청구항 1; 단락 [0019]-[0023]; 도면 3 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2015-0098089 A (한국과학기술연구원) 2015.08.27 전체 문헌 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2007-0011068 A (다카기 산교 가부시기가이샤) 2007.01.24 전체 문헌 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0040697 A (유니베르시테이트 레이덴) 2012.04.27 전체 문헌 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-1446526 B1 (주식회사 퀴타메트릭스 등) 2014.10.08 전체 문헌 참조.</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-2015-0048958 A (인하대학교 산학협력단) 2015.05.11 청구항 1; 단락 [0019]-[0023]; 도면 3 참조.	1-12	A	KR 10-2015-0098089 A (한국과학기술연구원) 2015.08.27 전체 문헌 참조.	1-12	A	KR 10-2007-0011068 A (다카기 산교 가부시기가이샤) 2007.01.24 전체 문헌 참조.	1-12	A	KR 10-2012-0040697 A (유니베르시테이트 레이덴) 2012.04.27 전체 문헌 참조.	1-12	A	KR 10-1446526 B1 (주식회사 퀴타메트릭스 등) 2014.10.08 전체 문헌 참조.	1-12
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
A	KR 10-2015-0048958 A (인하대학교 산학협력단) 2015.05.11 청구항 1; 단락 [0019]-[0023]; 도면 3 참조.	1-12																		
A	KR 10-2015-0098089 A (한국과학기술연구원) 2015.08.27 전체 문헌 참조.	1-12																		
A	KR 10-2007-0011068 A (다카기 산교 가부시기가이샤) 2007.01.24 전체 문헌 참조.	1-12																		
A	KR 10-2012-0040697 A (유니베르시테이트 레이덴) 2012.04.27 전체 문헌 참조.	1-12																		
A	KR 10-1446526 B1 (주식회사 퀴타메트릭스 등) 2014.10.08 전체 문헌 참조.	1-12																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2017년 01월 13일 (13.01.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 01월 13일 (13.01.2017)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 조기훈 전화번호 +82-42-481-5655 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/013732

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0048958 A	2015/05/11	KR 10-1575085 B1	2015/12/08
KR 10-2015-0098089 A	2015/08/27	없음	
KR 10-2007-0011068 A	2007/01/24	CN 1900265 A	2007/01/24
		CN 1900265 C	2008/11/19
		EP 1746154 A1	2007/01/24
		JP 2007-020493 A	2007/02/01
		JP 4689383 B2	2011/05/25
		KR 10-0841189 B1	2008/06/24
		US 2007-0020750 A1	2007/01/25
		US 7892821 B2	2011/02/22
KR 10-2012-0040697 A	2012/04/27	AU 2010-265110 A1	2010/12/29
		CA 2765732 A1	2010/12/23
		CN 102481571 A	2012/05/30
		EP 2442909 A1	2012/04/25
		JP 2012-529896 A	2012/11/29
		US 2012-0164679 A1	2012/06/28
		US 9315768 B2	2016/04/19
		WO 2010-149292 A1	2010/12/29
KR 10-1446526 B1	2014/10/08	CN 105209595 A	2015/12/30
		EP 2987851 A1	2016/02/24
		US 2016-0075985 A1	2016/03/17
		WO 2014-178692 A1	2014/11/06